

**SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER
HISTOKOMPATIBILITÄTSANTIGENE DES HUNDES**

Thomas Schramm

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553810_0007

AUS DER KINDER - POLIKLINIK
DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF.DR. H. SPIESS

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER HISTOKOMPATIBILITÄTSANTIGENE
DES HUNDES

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde in der gesamten Medizin der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Schramm

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Spiess

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. D. Albert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12. 1976



Inhaltsverzeichnis

I.	<u>Einleitung</u>	1
	Die Blutgruppen der Leukozyten	1
	Leukozyten-Iso-Antigene und Transplantatabstossung	1
	Leukozyten-Iso-Antigene und Krankheitsdisposition	2
	Die Histokompatibilitätsantigene des Menschen, der Maus und der Primaten	2
	Der Hund als experimentelles Modell	3
	Entwicklung der DLA-Forschung	4
	Das genetische Modell des DLA-Systems	5
	Die bisher bekannten DLA-Antigene	9
	Die Aufgaben der vorliegenden Arbeit	10
II.	<u>Methodik</u>	11
	Lymphozytotoxizitätstest	11
	Absorption von Seren	12
	Einfrieren von Lymphozyten	13
III.	<u>Material</u>	14
IV.	<u>Produktion von Antiseren</u>	14
	Methode	14
	Resultate	15
	Spezifitäten der Seren	16
	Statistische Auswertung der Seren	20

V.	<u>Analyse der DLA-Antigene in Familien</u>	25
	Modell der chromosomalen Vererbung	25
	Erkennung der Antigene verschiedener Chromosomen durch Antiseren	27
	Die DLA-Antigene DLA-B 6 und DLA-B 12	30
	Festlegung der Spezifitäten durch Segregationsanalysen	32
	Absorptionsuntersuchungen der Kreuzreaktionen	35
	Familienuntersuchung der Kreuzreaktionen	37
	Absorptions- und Familienuntersuchungen der Kreuzreaktionen des Serums L 315 (Anti-DLA-B ₆)	40
	Absorptions- und Familienuntersuchung der Kreuzreaktionen zwischen DLA-A ₂ und A ₉	43
	Die Spezifität DLA-A 1	44
	Absorptions- und Familienuntersuchung des Serums C 11 (Anti 3-12)	45
	Crossing-Over	46
VI.	<u>Die Verteilung der DLA-Antigene in einer Population unverwandter Hunde</u>	48
	Notwendigkeit der Untersuchung unverwandter Populationen	48
	Material	48
	Die Antigene des ersten Locus	48
	Phänotyp- und Genotypfrequenzen	49
	Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	49
	Aussagekraft des Ergebnisses	52

Die Antigene des zweiten Locus	52
Phänotyp- und Genotypfrequenzen	53
Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	53
Aussagekraft des Ergebnisses	54
VII. <u>Diskussion</u>	55
Mikrozytotoxizitätstest	55
Verdünnung von Seren	56
Immunisierung	56
Absorption von Seren	57
VIII. <u>Die klinische Bedeutung der DLA-Strukturen</u>	60
IX. <u>Zusammenfassung</u>	62
X. <u>Danksagungen</u>	66
XI. <u>Literaturverzeichnis</u>	67

I. Einleitung

Vor jeder Bluttransfusion werden Tests durchgeführt, um festzustellen, ob das Blut des Spenders für den Empfänger verträglich ist. Für die Verträglichkeit verantwortlich sind die schon lange bekannten roten Blutgruppen (Iso-Agglutinogene), die ein codominant erbliches System darstellen. Auch die weißen Blutzellen besitzen eigene Blutgruppen, die erblich sind (Leukozyten-Iso-Antigene). Ihre Erforschung wurde erheblich intensiviert, als man herausfand, daß sie als Transplantationsantigene (Histokompatibilitätsantigene) wirken und sich nicht nur auf den Leukozyten, sondern auf fast allen Zellen des Körpers außer den Erythrozyten befinden.

So stellte 1946 Medawar (37) fest, daß Hauttransplantate zwischen Mäusen beschleunigt abgestoßen werden, wenn der Empfänger vorher mit Leukozyten des Spenders immunisiert war (second-set-reaction). Dasselbe wurde von Friedmann (24) 1961 beim Menschen beobachtet. Umgekehrt bewirken Hauttransplantate, aber auch die Transplantation anderer Organe die Produktion zytotoxischer Antikörper, die die Leukozyten des Spenders lysieren. Ferner konnte Ceppellini (13) zeigen, daß die Überlebensdauer von Transplantaten vom Grad der genetischen Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger abhängt. Die Untersuchung der Leukozyten - Iso - Antigene stellt eine

Möglichkeit dar, bei Organtransplantationen eine möglichst weitgehende Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger (Gewebeverträglichkeit = Histokompatibilität) durch entsprechende Spender-Auswahl (Donor-selection) zu erzielen.

Die Leukozyten-Iso-Antigene spielen nicht nur für die Transplantationschirurgie eine Rolle, sondern sie lassen sich auch zum Nachweis der Empfänglichkeit für bestimmte Krankheiten verwenden (2): Bei Patienten mit multipler Sklerose, Diabetes Mellitus Juvenilis, Morbus Bechterew und anderen Krankheiten wurden für bestimmte Histokompatibilitäts-Antigene (HLA-Antigene) signifikant höhere Frequenzen festgestellt als in der Gesamtbevölkerung. Die Erforschung dieser Zusammenhänge wird es sicher einmal möglich machen, anhand eines Screening-Systems die Empfänglichkeit für bestimmte Krankheiten festzustellen und entsprechende prophylaktische Maßnahmen zu treffen.

Obwohl das System der Histokompatibilität beim Menschen (HLA= Human Leukocyte Antigen Locus A) schon weitgehend aufgeklärt ist, ist es eine wesentliche Aufgabe der experimentellen Medizin, das System der Leukozyten-Iso-Antigene an Labortieren zu erforschen, um sowohl für Organtransplantationen als auch die Zusammenhänge der Histokompatibilität mit bestimmten Krankheiten Modelle formulieren zu können, die auf den Menschen anwendbar sind. Am weitesten aufgeklärt

ist das Histokompatibilitäts-System der Maus (H 2). Die Maus ist aber für die weitere experimentelle Verwendung ungeeignet, da sie aufgrund der Inzucht bei Labortieren und der starken Abweichung wilder Stämme von einer weitgehend ausgezüchteten Populationsstruktur kein Modell für die ausgezüchtete Species Mensch darstellen kann (5,32,33).

Von allen Säugetieren sind dem Menschen am genetisch ähnlichsten die Primaten. Beim Schimpansen und beim Rhesus-Affen wurden die Leukozyten-Iso-Antigene weitgehend untersucht - beim Schimpansen wurde sogar festgestellt, daß ein ChLA-Antigen nahezu identisch mit der Spezifität HLA-A11 ist (8,10,58). In der weiteren experimentellen Verwendung stellen sich jedoch immense Schwierigkeiten heraus, sowohl in der Beschaffung als auch in der Pflege und in der langen Schwangerschaft, die eingehende Familienanalysen stark erschwert.

Der Hund hingegen hat den Vorteil, daß er ähnlich wie der Mensch weit verbreitet ist und als weitgehend ausgezüchtet angesehen werden kann (4). Weitere Vorteile sind seine günstige Größe für Transplantationen und die relativ leichte postoperative Pflege, außerdem die Tatsache kurzer Schwangerschaften, die die bei genetischen Studien unerläßlichen Familienanalysen wesentlich erleichtern. Schließlich ist der Hund aufgrund seiner bereits Jahrtausende alten Domestikation

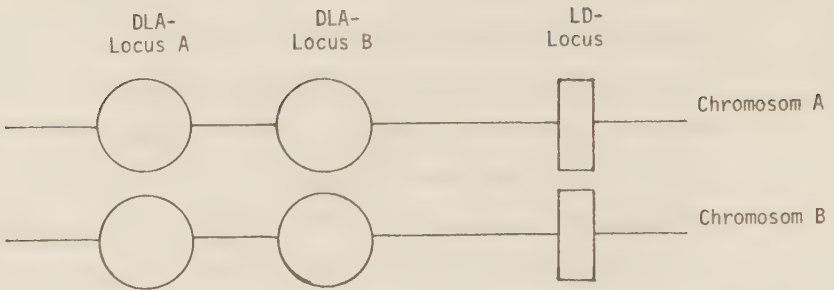
ähnlichen pathogenen Mechanismen ausgesetzt wie der Mensch. Dementsprechend kommen auch beim Hund eine Reihe von Krankheiten des Menschen vor. So könnten Zusammenhänge zwischen bestimmten Histokompatibilitätsantigenen des Hundes (DLA = Dog Leukocyte-Antigene Locus A) und bei ihm auftretenden Krankheiten wichtige Hinweise für die klinische Medizin geben.

Die DLA-Antigene wurden im Zusammenhang mit Transplantationsversuchen immer wieder am Rande untersucht (14,15,23,45). Genauere Untersuchungen finden aber erst seit 1968 statt. Epstein et al. beschrieben als erste die Produktion und Verwendung cytotoxischer Antiseren zur Spender-Empfänger-Selektion bei Knochenmarks-Transplantationen am Hund (21). Im Anschluß daran stellten Rapaport et al. genauere Untersuchungen über die Histokompatibilitätsantigene des Hundes an (6,7,16,40,41,42,43). Templeton und Thomas konnten 1971 die Existenz eines von Genen eines Chromosoms abhängigen Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (=MHC, major histocompatibility complex) nachweisen, den sie analog zum MHC des Menschen (HLA) DLA nannten (49). Die serologisch nachweisbaren Antigene wurden 1970 bis 1973 von Vriesendorp näher untersucht (52,53,54,55). Die zellulär nachweisbaren Antigene, von denen zuerst angenommen wurde, sie seien identisch mit den serologisch nachweisbaren, konnten von van den Tweel et. al

als Produkt eines eigenen Locus erkannt werden (51). Nähere Aufschlüsse über einige dieser Antigene konnten Grosse-Wilde et. al 1973 (26,27,28) sowie Gluckman et al. (25) leisten. Seit 1973 finden in größeren Abständen internationale Workshops über die Immunogenetik des Hundes statt, auf denen Daten der einzelnen beteiligten Labors verglichen, einheitliche Nomenklaturen und standardisierte Methoden entwickelt werden (30,31).

Das genetische Modell des DLA-Systems oder allgemein Major Histocompatibility Complex (= MHC), dessen Grundzüge den MHCs anderer Säugetiere ähnlich sind, stellt sich heute folgendermaßen dar (30,31):

Die Leukozyten-Iso-Antigene werden wie fast alle serologischen Marker als co-dominante Merkmale vererbt. Kinder einer Familie besitzen keine Antigene, die nicht wenigstens bei einem Elternteil vorhanden sind. Jedes Individuum besitzt vier Antigene, von denen sich jeweils zwei allelisch verhalten. Der Grund dafür ist in der Existenz zweier Loci A und B, die eng benachbart sind, zu suchen. Jeweils zwei auf einem Chromosom codierte Antigene bilden einen Haplotyp (z.B. DLA 2 und 4 oder 9 und 6) (12,13). Ein dritter Locus des DLA-Systems ist der Genort der LD-Antigene, die sich ebenfalls allelisch verhalten und mit bestimmten SD-Haplotypen hoch assoziiert sind (s.Figur I.1.)

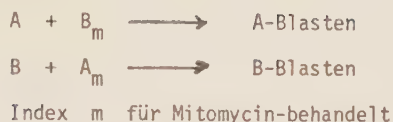


Figur I.1.

Die LD -Antigene werden mit Hilfe der gemischten Leukozyten-Kultur definiert, die bereits an dieser Stelle näher beschrieben werden soll, da sie für einige Abschnitte dieser Arbeit wichtig ist.

Die MLC ist eine Methode, mit deren Hilfe die Gewebeverträglichkeit (=Histokompatibilität) in einem zellulären System bestimmt werden kann. Die MLC beruht darauf, daß sich die Lymphozyten zweier genetisch unterschiedlicher Individuen A und B derselben Spezies gegenseitig als fremd erkennen und zur Bildung von Blastzellen stimulieren (Zweiweg-Reaktion: $A + B \longrightarrow A\text{-Blasten und } B\text{-Blasten}$). Die Bildung der Blastzellen kann quantitativ an der Einbaurate von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen werden. Um die Zweiwegs-Reaktion in zwei Einwegsreaktionen aufzuteilen, werden die Zellen des einen Individuums durch Bestrahlung oder Mitomycin zwar in ihrer Teilungsfähigkeit gehemmt, behalten aber ihre Antigenität und stimulieren die Lymphozyten des anderen Individuums zur Bildung von

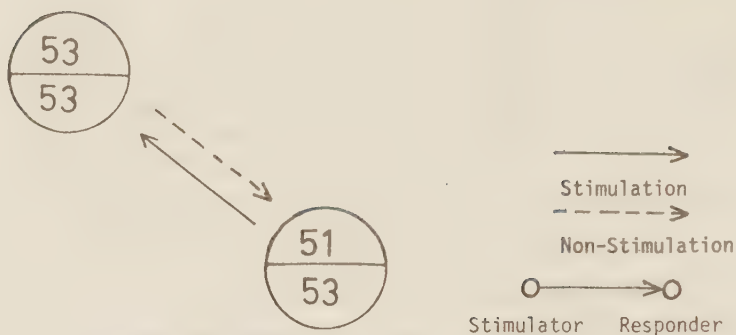
Blastzellen:



Zunächst wurden die zellulären Reaktionen in der MLC als Reaktion der serologisch definierten Histokompatibilitätsantigene interpretiert. Es fanden sich jedoch Familien, in denen serologisch identische Geschwister eine gegenseitige Stimulation in der MLC aufwiesen, was am einfachsten durch die Annahme einer Rekombination zwischen den SD-Loci und einem getrennten MLC-Locus erklärt werden kann. (5,9,18,51)

Dieser LD-(=leukocyte defined) Genort ist mit den beiden SD-Loci eng gekoppelt, was bewirkt, daß die SD-Allele mit den LD-Allelen in der unverwandten Population hoch-assoziiert sind.

Zur Bestimmung der LD-Allele werden die Zellen eines sowohl serologisch, als auch MLC - homozygoten Individuums als Referenzzellen verwendet. Besitzt z.B. ein Hund die DLA-Haplotypen 3-12 und 2-5 (MLC-Eigenschaften 53 + 51), so stimuliert er zwar die Zellen des Referenzhundes für die Eigenschaft DLA 53, eine Stimulierung in die andere Richtung erfolgt aber nicht, da die für DLA 3-12 -53 homozygoten Referenz-Zellen von den 3-12-53/2-5-51 heterozygoten Zellen nicht als fremd erkannt werden. (Figur 1.2.)



Figur I.2.

Auf diese Weise können viele SD-Typen auch durch MLC-Untersuchungen definiert werden.

Vermutlich haben SD-Antigene und LD-Antigene verschiedene Aufgaben in der Transplantat-Abstoßung:

Die LD-Strukturen bewirken zunächst beim Empfänger eine Proliferation der reaktiven Zellklone. Diese Proliferation ist eine Voraussetzung für die Produktion von zytotoxischen Lymphozyten und wohl auch von Antikörpern, die gegen die SD-Antigene des Spenders gerichtet sind. (20,44)

Die in dieser Arbeit verwendeten MLC-Daten wurden freundlicherweise von Dr. med. H. Grosse-Wilde, Institut für Hämatologie, Abteilung Immunologie der GSF München, zur Verfügung gestellt.

Neben der gesicherten Existenz der drei bisher beschrie-

benen Loci gibt es bereits Hinweise auf weitere Loci des DLA-Systems (MHC), deren Nomenklatur entsprechend erfolgen würde: DLA-C, DLA-D usw., sowie auf die Existenz von Histokompatibilitätsantigenen, die von Genorten auf anderen Chromosomen codiert werden. Diese sind vorläufig als Non-DLA-Strukturen zu bezeichnen, bei gesicherter Existenz als DLB, DLC usw. Aufgrund ihrer untergeordneten Rolle im Histokompatibilitätssystem werden sie als Minor Histocompatibility Antigene bezeichnet.(31)

Folgende Antigene des DLA-Systems sind bisher bekannt (30,31):

Tabelle I.1.

Locus A (1. Serie):

DLA-A 1	Es bestehen Kreuzreaktionen zwischen:
DLA-A 2	DLA - A 3,7 und 10
DLA-A 3	und zwischen
DLA-A 7	DLA - A 2 und 11
DLA-A 8	
DLA-A 9	
DLA-A 10	
DLA-A 11	(gehört eventuell zu DLA-C)
blank	(noch nicht definierte Antigene, mehr als 1 Prozent)

Locus B (2.Serie):

DLA-B 4	Kreuzreaktionen zwischen:
DLA-B 5	DLA-B 5 und 13
DLA-B 6	und
DLA-B 12	DLA-B 6 und 12

Fortsetzung Tabelle 1.1.:

DLA-B 13

DLA-B 14

blank (über 50 Prozent)

<u>LD-Locus:</u>	<u>assoziiert mit den SD-Haplotypen:</u>
DLA 50	2- 4
DLA 51	2- 5
DLA 52	9- 6
DLA 53	3-12
DLA 54	10- 5/7-12
DLA 55	3-b1 (3-6 ?)
DLA 56	1-13
DLA 57	8-13
DLA 58	9- 4
V	7-13
Y	B1- 4
Z	B1-B1

V,Y und Z sind noch unnummeriert, da über sie noch keine internationale Übereinkunft getroffen wurde.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das System der Histokompatibilitäts-Antigene des Hundes in weiteren Einzelheiten aufzuklären. Die dazu unternommenen Schritte lassen sich unter folgenden Gesichtspunkten zusammenfassen:

1. Produktion von Antiseren
2. Typisierung von Familien

3. Segregationsanalyse
4. Verteilung der DLA-Antigene in einer zufällig
ausgewählten Population von Hunden (Random Sample).

II. Methodik

In diesem Kapitel werden nur die allgemein angewandten Methoden erläutert. Die in einzelnen Kapiteln speziell angewandten experimentellen und statistischen Methoden werden dort erläutert.

1. Lymphozytotoxizitätstest (LCT)

a) Zellpräparation

Zehn Milliliter venöses Blut werden defibriniert und mit isotoner Kochsalz-Lösung im Verhältnis 1:2 verdünnt. Das verdünnte Blut wird über Ficoll-Isopaque-Lösung ($D = 1,077$) 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der entstehende Lymphozytenring wird abgehoben und 15 Minuten bei 160 g in Hank'scher Lösung gewaschen. Die Zellen werden auf 2000 pro Mikroliter eingestellt.

b) DLA-Testung (in Anlehnung an den NIH-Test) (50)

Die Zellsuspension wird zusammen mit dem Serum auf Mikrotestplatten (Terasaki-Tray) eingespritzt, wobei pro Vertiefung je ein Mikroliter Serum oder Serum verdünnt in Hank'scher Lösung und Zellsuspension unter einem Film von Paraffin-Öl zusammengegeben werden. Nach 30 Minuten Inkubation bei

Zimmertemperatur -während dieser Zeit verbinden sich die Antikörper des Serums mit den Antigenen auf der Zelloberfläche- wird Komplement aus gepooltem Kaninchenserum (fünf Mikroliter) hinzugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Zimmertemperatur wird mit 5 Mikroliter Eosin gefärbt und mit 5 Mikroliter Formalin fixiert. Die Ablesung erfolgt im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop, in dem der Prozentsatz der lysierten (= gefärbten) Zellen geschätzt wird. Eine Zytolyse bedeutet, daß eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat.

2. Absorption von Seren

Die beschriebenen Methoden werden verwendet, um multispezifische Seren (d.h. solche, die mehrere Spezifitäten enthalten) genauer auf ihre Spezifitäten untersuchen zu können, bzw. monospezifische Seren (d.h. solche mit nur einer Spezifität) zu erhalten.

a) Absorption mit Lymphozyten

Eine Lymphozytensuspension wird wie unter 1 a beschrieben hergestellt. Anstatt in Hank'scher Lösung werden die Lymphozyten aber in dem zu absorbierendem Serum im Verhältnis 1:1 resuspendiert und nach 45 Minuten entfernt, wobei die zu absorbierenden Antikörper sich mit den Lymphozyten verbunden haben.

Da die DLA-Antigene auf Lymphozyten, Thrombozyten und Granulozyten zu finden sind, kann auch die Gesamtheit der weißen Zellen (Buffy-Coat) zur Absorption verwendet werden.

b) Absorption mit Buffy-Coat

Heparinisiertes venöses Blut wird 30 Minuten bei 650 g zentrifugiert. Die weißen Zellen werden als sog. Buffy-Coat an der Grenze zwischen Plasma und Erythrozyten sichtbar und können abgehoben werden. Um eine möglichst reine Zellsuspension herzustellen, wird mehrmals mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen (jeweils 30 Minuten bei 160 g). Anschließend werden die Zellen im Volumenverhältnis 1:1 im zu absorbierenden Serum resuspendiert und können nach Anlagerung der Antikörper nach einer 45-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur entfernt werden.

3. Einfrrieren von Lymphozyten

Zellen, die man zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal testen will, können eingefroren werden. Wie unter 1 a beschrieben werden die Zellen gewaschen und auf 2000 pro Mikroliter eingestellt. Die Hank'sche Lösung wird abzentrifugiert, die Zellen im selben Volumen einer Gefrierlösung, die anteilmäßig aus 50 % McCoy's 5a Medium, 40 % Hank'scher Lösung und 10 % DMSO (=Dimethylsulfoxyd $(CH_3)_2SO$) besteht,

resuspendiert. Nach einer halbstündigen Inkubation bei -20 Grad Celsius können die Zellen mehrere Monate bei -80 Grad Celsius aufbewahrt werden. Das Auftauen der Zellen geschieht bei Zimmertemperatur unmittelbar vor der Verwendung. DMSO muß nicht mehr ausgewaschen werden.

III. Material

Für die Familienstudie wurden 34 Hundefamilien getestet, davon vier Beagle-Familien und zwei Labradorfamilien aus dem radiobiologischen Institut REPGO-TNO, Rijswijk, Niederlande, 27 Beagle-Familien aus der Zucht der Gesellschaft für Strahlenforschung/München-Neuherberg, und eine Mischlings-Familie aus der medizinischen Tierklinik der Universität München.

Für die Studie über unverwandte Hunde wurden die Eltern der Familien verwendet, soweit sie nicht miteinander verwandt waren, 48 Patienten der Medizinischen Tierklinik der Universität München, 11 Hunde aus der Zucht Gassner/Sulzfeld, 24 Hunde der Versuchstierhandlung Riedl München/Feldmoching und 20 Hunde des REPGO-TNO, Rijswijk/Niederlande.

IV. Produktion von Antiseren

a) Methode:

Antiseren können grundsätzlich auf zwei verschiedene Weisen hergestellt werden: Einmal durch Immunisierung zwischen Individuen verschiedener Spezies (Xeno-Immunisierung), zum zweiten zwischen Individuen derselben Spezies (Allo-Immunisierung). Der Nachteil der Xeno-Immunisierung, daß sie gegen eine Vielzahl verschiedener Antigene erfolgt, macht diese Methode ungeeignet für die Aufklärung der DLA-Antigene. Zudem ist es fraglich, ob ein Mitglied einer anderen Spezies in der

Lage ist, die Histokompatibilitäts-Antigene des Hundes zu erkennen.

Aus diesem Grunde werden beim Studium der Histokompatibilitäts-Antigene Allo-Immunisierungen verwendet.

Diese können auf drei verschiedenen Wegen erfolgen:

- Durch Schwangerschaften. Im Serum der Mutter werden Antikörper gegen Leukozyten des Kindes gefunden. Dieser Weg wird bei der Typisierung der menschlichen Leukozytenantigene beschritten.
- Immunisierung durch Leukozyten (= Buffy-Coat) oder Vollblut.
- Durch "First-Set"-Abstoßungen von Organ- oder Hauttransplantaten. Der Nachteil dieser Methode ist, daß in vielen Fällen Hyperimmuneren entstehen, die neben den DLA-Antikörpern auch andere cytotoxisch wirkende Antikörper enthalten.

Die in dieser Arbeit behandelten Antiseren wurden teils durch Hauttransplantationen, teils durch Immunisierung mit Leukozyten oder Vollblut produziert. Seren von Hunden, die mit Haut immunisiert waren, wurden im Durchschnitt eine Woche nach Abstoßung abgenommen, die anderen Seren etwa vier Wochen nach der Immunisierung. Waren die Seren negativ in Bezug auf cytotoxische Antikörper gegen die Spenderlymphozyten, wurde mit Buffy-Coat oder mit Vollblut nachimmunisiert (geboostert) und die Seren in wöchentlichen Abständen auf Antikörper untersucht. In einigen Fällen war eine zweite Boosterung notwendig, die wiederum einen Monat später vorgenommen wurde.

b) Resultate:

Es wurden dreiundreissig Hunde immunisiert, wobei Spender und Empfänger nach ihren Gendifferenzen ausgesucht wurden. Will man z.B. ein Serum erhalten, das Antikörper gegen DLA-B 5 enthält, so kann man als Spender

einen Hund mit DLA 2-4/2-5, als Empfänger einen mit DLA 2-4/2-4 nehmen. Dabei gelang es, einige Seren zu produzieren, durch die bisher schlecht definierte Spezifitäten eindeutig festlegbar sind, z.B. Serum L23 (Anti-DLA 12) und Serum L315 (Anti-DLA 6).

Bei sechs Hunden entwickelten sich keine oder zu wenig Antikörper, sieben Seren waren zu multispezifisch. Als multispezifisch werden solche Seren bezeichnet, die mit über 60% der Zellen aller unverwandten Hunde reagieren, also ein zu breites Reaktionsmuster zeigen.

Tabelle IV.1. Resultate der Serumproduktion

Empfänger (DLA)	Spender (DLA)	Positiv nach	Titer	Spezifität d. Serums
D 16 2-4/2-5	D 18 2-4/9-6 (+12)	1 Booster	1:32	9,6 (+12)
D 17 2-4/2-5	D 18 2-4/9-6 (+12)	2 Boosters	1:16	9,6 (+12)
D 18 2-4/9-6 (+12)	D 17 2-4/2-5	2 Boosters	1:32	5
M 3 9-6/(2)-4	L 17 1-13/1-13	Immunisation	1:4	1,13
D 14 2-4/2-5	L 17 1-13/1-13	negativ 2 Boosters		
3437 2-5/9-6	L 17 1-13/1-13	Immunisation	1:16	1,13
N 81 2-4/3-12	L 17 1-13/1-13	negativ 2 Boosters		

Fortsetzung von Tabelle IV.1.

Empfänger (DLA)	Spender (DLA)	Positiv nach	Titer	Spezifität d. Serums
N 82 2-4/3-12	L 17 1-13/1-13	1 Booster	1:1	1,13
N 67 2-4/2-5	L 17	negativ 2 Boosters		
N 85 2-4/2-4	3436 9-6/9-6	1 Booster	1:8	9,6
N 79 2-4/3-12	3436 9-6/9-6	1 Booster	1:4	9,6
7378 2-4/2-4	3436 9-6/9-6	1. Booster	1:16	9,6
D 27 2-4/3-12	3436 9-6/9-6	1. Booster	1:8	9,6
N 43 2-4/2-5	3436 9-6/9-6	Immunisation	1:16	9,6
L 23 3-6/2-5	L 315 3-12/2-5	1. Booster	1:8	12
L 315 3-12/2-5	L 23 3-6/2-5	4. Booster	1:2	6
C 8 3-12/9-6	N 33 2-4/3-12	Immunisation	1:16	2,4
C 9 3-12/9-6	N 33 2-4/3-12	Immunisation	1:8	2,4

Fortsetzung von Tabelle IV.1.

Empfänger (DLA)	Spender (DLA)	Positiv nach	Titer	Spezifität d. Serums
C 10 2-5/3-12	N 33 2-4/3-12	Immunisation	1:16	4
C 11 2-4/9-6	N 33 2-4/3-12	Immunisation	1:16	3,12
L 328 9-6/9-6	B 270 3-12/3-12	Immunisation	1:32	3,12
L 335 2-5/9-6	B 270 3-12/3-12	negativ 2 Boosters		
L 306 9-6/9-6	L 307 9-6/3-6	2. Booster	1:2	3
O 8 3-12/1-13	D 8 3-12/9-6	Immunisation	1:16	9-6
D 4 2-4/3-12	D 6 9-6/3-12	1. Booster	1:2	9-6
D 6 9-6/3-12	D 4 2-4/3-12	1. Booster	1:2	2-4
L 24 3-12/2-4	L 372 3-12/3-6	2. Booster	1:4	6
C 8 II 3-12/9-6	C 13 2-5/2-5	Immunisation	1:8	2,5
N 66 2-4/2-5	L 306 9-6/9-6	Immunisation	1:64	9,6

Fortsetzung von Tabelle IV.1.

Empfänger (DLA)	Spender (DLA)	Positiv nach	Titer	Spezifität d. Serums
N 80 2-4/3-12	L 306 9-6/9-6	Immunisation	1:64	9,6
N 92 2-4/2-5	L 306 9-6/9-6	Immunisation	1:64	9,6
N 40 2-4/2-5	4198 D 9-4/9-4	1. Booster	1:2	9
N 65 2-4/2-5	4198 D 9-4/9-4	1. Booster	1:32	9

Ober die in Tabelle 1 aufgeführten Seren hinaus standen noch folgende Seren zur Verfügung, die bei den beiden bisherigen "Workshops on Canine Immunogenetics" untersucht wurden und aus verschiedenen Labors stammen (aufgrund der geringen vorhandenen Mengen wurde auf die Untersuchung des Titers verzichtet):

Tabelle IV.2.

Serum	Spezifität	Serum	Spezifität
35	1	77	3,R 15
56	1,13	38	3,10
262	1,13	148	5
238	1,13	164	5
3895	13	69	5
36	2	D 5 b	7,5
23	2	B 30	8
12	2	243	9
14009	2	202	9
61	3	151	9
178	3	212	9,12

Fortsetzung von Tabelle IV.2.

Serum	Spezifität	Serum	Spezifität
B 26	10	167	10
Ca 34	11	145	10,11
46	6	143	10,11
52	6	66	9,12
93	6	64	9,12
135	6	5265	3,12
182	7,13	65	12
184	7	79	12
186	7	117	11
40	7,5	251	11
41	8	125	11
165	8	126	11
42	8	08	9,6
211	8	D 4	9,6
45	10	D 6	2,4

Um Aussagen über die Güte der Seren treffen zu können, wurde für jedes Serum eine Zwei-Mal-Zwei-Tabelle angefertigt, die eine Relation herstellt zwischen der bei einem Serum erwarteten DLA-Spezifität und seinen tatsächlichen Reaktionen. In Tabelle IV.3.2. sind die Ergebnisse der Zwei-Mal-Zwei-Tests für jedes einzelne Serum angegeben.

Dabei bedeutet:

- A +/+ : Anzahl der Reaktionen eines Serums, die mit der erwarteten Spezifität übereinstimmen
- B +/- : Anzahl der Reaktionen des Serums, die andere als die erwartete Spezifität erfaßte (falsch positive bzw. Extrareaktionen)
- C -/+ : Anzahl der Hunde, bei denen das Serum die erwartete Spezifität nicht erkannte (falsch negative Reaktionen)

- D-/- : Anzahl der Hunde, bei denen weder das untersuchte Serum reagierte, noch die erwartete Spezifität auftrat.
- N : Gesamtzahl der mit dem jeweiligen Serum untersuchten Hunde ($N=A+B+C+D$)

Die relativ hohen Zahlen in Rubrik B (Extrareaktionen) bei der Auszählung jeder einzelnen Spezifität in Seren, die mehrere DLA-Antikörper enthalten, beruhen auf der Tatsache, daß diese Spezifitäten in jeweils verschiedenen Kombinationen auftreten. So reagiert ein Serum, das z.B. die Spezifitäten DLA 9 und DLA 6 enthält, mit Lymphozyten, die die Haplotypen 9-4 tragen genauso wie mit solchen, die den Haplotyp 3-6 tragen. Tabelle IV.3.1. zeigt die Anzahl und Kombinationen aller Haplotypen in der getesteten Population.

Tabelle IV.3.1.

Haplotyp	Anzahl (absolute Frequenz)
1-13	32
2- 4	79
2- 5	50
2-13	4
3- 4	3
3- 5	4
3- 6	6
3-12	25
3-13	3
3-b1	10
7-12	6
9- 4	27
9- 5	3
9- 6	64
9-12	4

Fortsetzung Tabelle IV.3.1.

Haplotyp	Anzahl (absolute Frequenz)
9-b1	2
10-12	2
b1- 5	8
b1-12	20

Tabelle IV.3.2.

Serum	Spezifität	+/+	+/-	-/+	-/-	N	Chi-Quadrat
D 16	DLA 9	92	29	0	86	207	207
	DLA 6	65	56	0	86	207	
	DLA 12	42	79	11 ⁺	75	207	
	DLA 9+6+12	122	0	0	85	207	
D 17	DLA 9	91	24	1	91	207	146,1
	DLA 6	65	50	0	92	207	
	DLA 12	37	78	16 ⁺	76	207	
	DLA 9+6+12	116	4	6	81		
N 43	DLA 9	92	0	0	115	207	207
	DLA 6	65	27	0	115	207	
	DLA 9+6	96	0	0	111		
O 8	DLA 9 ⁺⁺	85	52	7	63	207	166,4
	DLA 6	62	79	3	63	207	
	DLA 9+2+6	136	0	9	54	207	
D 4	DLA 9 ⁺⁺	79	2	13	73	171	148,6
	DLA 6	63	18	2	84	171	
	DLA 9+2+6	82	0	6	83	171	
N 40	DLA 9	12	0	3	24	39	27,73
N 65	DLA 9	14	1	1	23	39	31,0
L 315	DLA 6	54	13	6	84	157	88,91
L 23	DLA 12	51	5	2	149	207	172,73
L 328	DLA 3	60	96	0	51	207	
	DLA 12	53	103	0	51	207	

+ Die falsch negativen Reaktionen von D 16 und D 17 im Vergleich mit DLA 12 entstehen durch die Spezifität 12 (-6)

++ Kreuzreaktion mit DLA 2

Fortsetzung Tabelle IV.3.2.

Serum	Spezifität	+/+	+/-	-/+	-/-	N	Chi-Quadrat
C 11	DLA 3+12	83	48	0	76		60,38
	DLA 3	53	39	7	108	207	
	DLA 12	45	47	8	107	207	
	DLA 3+12	75	18	8	106		115,6
M 3	DLA 1+13	46	12	0	149	207	151,94
3437	DLA 1+13	46	0	0	161	207	207
D 18	DLA 5(+13)	61	38	1	108	207	90,92
D 5 b ⁺	DLA 5	62	24	0	121	207	
	DLA 7	4	82	2	119	207	
	DLA 7+5	66	86	2	53		28,98
C 8	DLA 2	109	26	4	68	207	
	DLA 4	98	37	0	72	207	
	DLA 2+4	131	1	5	70		181,9
C 9	DLA 2	113	28	0	66	207	
	DLA 4	98	43	0	66	207	
	DLA 2+4	136	2	0	69		204
D 6	DLA 2	108	28	5	66	207	
	DLA 4	96	40	2	69	207	
	DLA 2+4	131	1	5	70		181,89
C 10	DLA 4	98	15	0	94	207	141,8
L 306	DLA 3	26	0	5	138	157	127,1
35	DLA 1	5	0	1	64	70	
36	DLA 2	41	2	6	21	70	
23	DLA 2	6	0	41	23	70	
48	DLA 4	29	1	1	39	70	
179	DLA 4	28	1	2	39	70	
47	DLA 4	27	0	3	40	70	
14009	DLA 4	28	0	2	40	70	
61	DLA 3	5	0	8	57	70	
178	DLA 3	12	4	1	51	70	
77	DLA 3	12	10	1	47	70	
38	DLA 3	12	4	1	53	70	

+ Kreuzreaktionen mit DLA 3

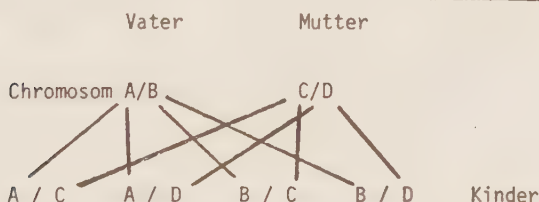
Fortsetzung Tabelle IV.3.2.

Serum	Spezifität	+/+	+/-	-/+	-/-	N
148	DLA 5	12	1	20	37	70
164	DLA 5	32	3	0	35	70
69	DLA 5	32	23	0	15	70
243	DLA 9	42	17	3	8	70
202	DLA 9	42	6	3	19	70
151	DLA 9	44	0	1	25	70
212	DLA 9	43	21	2	4	70
	DLA 12	3	61	3	3	70
46	DLA 6	38	3	3	26	70
52	DLA 6	30	1	11	28	70
93	DLA 6	37	10	4	19	70
135	DLA 6	32	2	9	27	70
66	DLA 12	6	52	0	12	70
	DLA 9	45	13	0	12	70
64	DLA 12	6	62	0	2	70
	DLA 9	45	23	0	2	70
5265	DLA 12	6	38	0	26	70
	DLA 3	12	32	1	25	70
65	DLA 12	4	2	2	62	70
79	DLA 13	6	14	0	50	70
56	DLA 13	2	0	4	64	70
262	DLA 13	3	0	3	64	70
238	DLA 13	6	45	0	19	70
3895	DLA 13	6	29	0	35	70

Diese Berechnung basiert auf Reaktionen, die bei der Analyse der DLA-Antigene in Familien auftraten, da nur aufgrund der Segregation in Familien zuverlässige Daten zu erzielen sind. Die aufgrund dieser Berechnungen und der Segregationsanalysen erzielten Daten über die einzelnen Seren werden dann im Kapitel "Analyse der DLA-Antigene in einer unverwandten Population" angewandt, um die Spezifitäten der einzelnen Hunde aufzuklären.

V. Analyse der DLA-Antigene in Familien

Die Analyse serologischer Daten läßt sich in Familien und unverwandten Hunden gleichermaßen durchführen. Unsicherheiten lassen sich jedoch am Überzeugendsten durch die Analyse einer Anzahl von Familien klären. Da die Leukozytenantigene wie fast alle serologischen Marker codominant vererbt werden, muß ein Serum, das DLA-Antikörper enthält, durch die Verteilung seiner Reaktionen in einer Familie eines der vier vorhandenen Chromosomen repräsentieren. Figur V.1. stellt die möglichen Kombinationen der elterlichen Chromosomen in einer Familie dar.



Figur V.1. Mögliche Kombinationen von Chromosomen der Eltern in einer Familie

Es gibt also maximal vier Kombinationsmöglichkeiten für die elterlichen Chromosomen, so daß in Familien mit mehr als vier Kindern mindestens zwei identisch sein müssen.

Figur V.2. zeigt die Erkennung der einzelnen Chromosomen durch vier Seren in einer hypothetisch angenommenen Familie mit fünf Kindern.

	S e r e n				Haplotypen
	1	2	3	4	
Vater	+	+			A B
Mutter			+	+	C D
Kind 1	+		+		A C
" 2	+			+	A D
" 3		+	+		B C
" 4		+		+	B D
" 5		+		+	B D
erkanntes Chromosom	A	B	C	D	

Figur V.2. Erkennung der vier Chromosomen in einer Familie durch vier Seren

Neben diesem für genetische Untersuchungen idealtypischen Modell, in dem alle vier elterlichen Chromosomen (A,B,C,D) unterschiedlich sind, gibt es noch die Möglichkeit, daß

- a) einer der beiden Elternteile homozygot ist
(also A / A oder C / C)
- b) beide Eltern homozygot sind, aber nicht identisch
(also A / A und C / C, so daß alle Kinder A und C erhalten) und
- c) beide Eltern homozygot und identisch sind
(also A / A und A / A), womit die Kinder wiederum alle untereinander und mit den Eltern identisch sind.

Beispiele für alle vier Möglichkeiten geben die Tabellen V.1. bis V.4.

Tabelle V.1. Familien mit vier unterschiedlichen
Haplotypen A, B, C und D

Seren	C	D	2	N	C	C	C	D	D	D	N	FAMILIE 4	
	9	1	1	4	1	8	9	6	1	0	4		
	a	6	2	3	0	I			8	8	3		
	I	a									a		
DLA-													
Antigene	2		9		4	2	+	4		5	6	Haplotypen	Segregation
Vater L3	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	2-5/9-6	A B
Mutter L15		+	+	+	+						+	9-4/9-6	C D
L 343		+	+	+	+	+	+	+	+		+	9-6/9-4	B D
L 344	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	9-6/2-5	A D
L 345	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		9-4/2-5	A C
L 346		+	+	+	⊖						+	9-6/9-6	B D
erkanntes Chromosom	A	B	C	D	C	A und C		A		B D			

Seren	C	C	C	D	D	D	2	N	5	L	1	3	M	FAMILIE 5	
	9	8	9	6	1	0	1	0	4	2	3	3	4		3
	a				8	8	6	2	3		1	5	3		
	I						a		a		5		7		
DLA- Antigene	2	2	+	4		5		9			6		1 +13	Haplot	Segr.
V L 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			2.5/9,6	A B
M L 12							+	+	+	+	+	+	+	9,6/1,13	C D
L 348							+	+	+	+	+			9,6/9,6	B C
L 349	+	+	+	+	+	+							+	2-5/1-13	A D
L 350							+	+	+	+	+	+	+	9-6/1-13	B D
L 351	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			9-6/2-5	A C
L 352							+	+	+	+	+	+	+	9-6/1-13	B D
erkanntes Chromosom	A		A		A		B,C		B, C		D				

Tabelle V.2. Familien, deren einer Elternteil
homozygot ist
FAMILIE 2

Seren	C	C	C	D	1	6	D	D	D	D	N	L	4	5	
	9	8	9	6	6	9	5	1	1	1	4	3	6	2	
	a				4		b	8	6	6	7	3	1		
	I								a				5		
DLA-															
Antigene	2	2	+	4				5			9		6		
Haplot.															
Segreg.															
V: D 13	+	+	+	+	+	+	+	+							
M: P481	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D 47	+	+	+	+	+	+	+	+							
D 48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D 49	+	+	+	+	+	+	+	+							
D 50	+	+	+	+	+	+	+	+							
D 51	+	+	+	+	+	+	+	+							
D 52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
erkanntes Chromosom	A und D								C						

FAMILIE 3

Seren	D	D	N	C	C	D	4	C	N	L	L ⁺	4	
	1	1	4	8	9	6	8	1	4	2	3	6	
	6	7	3					0	3	4	1		
									a		5		
DLA- Antigene	9	+	6	2	+	4		4			6		Haplotypen Segreg.
V: 4198 D	+	+	+	+	+	+	+	+			⊗	9-4/9-4	A A
M:P 318	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-6/9-4	C D
L 28	+	+	+	+	+	+	+	+			⊗	9-4/9-4	A D
L 29	+	+	+	+	+	+	+	+			⊗	9-4/9-4	A D
L 30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4/9-6	A C
L 31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4/9-6	A C
L 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4/9-6	A C
L 33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4/9-6	A C
erkanntes Chromosom	A,C u.D			A und D				C					

⁺zu den falsch-positiven Reaktionen von L 315 s.u. (S. 40)

Tabelle V.3. Familie 29: Homozygote, nicht identische Eltern

Seren	C	C	N	D	D	N	L	L	C	C	C	D	
	9	8	4	1	1	4	3	2	1	8	9	6	
a II			0	6	7	3	1	4	0				
							5						
DLA-Antigene	2		9	9	+	6	6	4	2	+	4	Haplotypen	Segregation
V: 4198D			+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4/9-4	A A
M:7382	+	+							+	+	+	2-4/2-4	B B
D 53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2-4/9-4	A B
D 54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2-4/9-4	A B
D 55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2-4/9-4	A B
D 56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2-4/9-4	A B
D 57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2-4/9-4	A B
D 58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2-4/9-4	A B
	B		A					A + B					

Tabelle V.4. Familie 25: Homozygote und identische Eltern

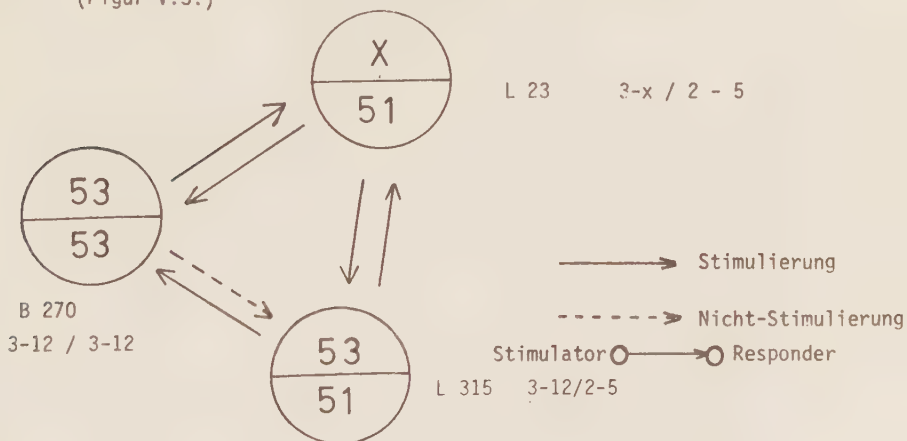
Seren	C	C	C	C	D	C	
	9	1	8	9	6	8	
a	o	I				II	
DLA-Antigene	2	4	2	+	4	2+5	Haplotypen Segregation
V:Tasso	+	+	+	+	+	+	2-4/2-4 A A
M:N 22	+	+	+	+	+	+	2-4/2-4 A A
N 167	+	+	+	+	+	+	2-4/2-4 A A
N 168	+	+	+	+	+	+	2-4/2-4 A A
N 169	+	+	+	+	+	+	2-4/2-4 A A
N 170	+	+	+	+	+	+	2-4/2-4 A A
N 171	+	+	+	+	+	+	2-4/2-4 A A
N 172	+	+	+	+	+	+	2-4/2-4 A A

Die Segregation der Antiseren bzw. ihrer Reaktionen läßt den Rückschluß zu, daß ihre Antikörper gegen DLA-Antigene gerichtet sind. Im Vergleich verschiedener Familien miteinander lassen sich neue Spezifitäten festlegen, und Spezifitäten, deren Definition durch Kreuzreaktionen (z.B. zwischen DLA-B 6 und 12 oder zwischen DLA-B 5 und 13) erschwert ist, auseinander trennen bzw. genauer definieren.

Die Spezifitäten DLA-B 6 und DLA-B 12

Die bei den beiden Workshops on Canine Immunogenetics verwendeten Seren zur Erkennung der Spezifitäten DLA-B 6 und 12 (s. Zwei-Mal-Zwei-Tabellen auf Seite 24, hier die Seren 212, 64, 65, 66 und 5265) zeigen deutlich die Kreuzreaktionen zwischen diesen beiden Spezifitäten. Typisierungsergebnisse mit diesen Seren mußten daher immer ungenau bleiben; bei der Angabe der Haplotypen konnte nicht genau festgelegt werden, ob es sich um DLA-B 6 oder 12 handelt. Daher müssen zur Festlegung solcher Spezifitäten die Daten der MLC herangezogen werden. Aufgrund der hohen Assoziationsrate der SD Loci und des LD-Locus ist die Identität serologischer Haplotypen auch zellulär nachweisbar. Einer der Hunde, dessen Zellen eindeutig den Haplotypen DLA 3-12 in homozygoter Form tragen, der Hund B 270, wird in der gemischten Lymphozyten-Kultur (MLC) als Referenzhund für die MLC-Spezifität DLA 53 verwendet (28). Von dieser Spezifität ausgehend wurden Immunisationsversuche durchgeführt: Der Hund L23 wurde mit Haut des Hundes L 315 immunisiert und L 315 mit Haut von L 23. Beide Hunde haben gemeinsam den Haplotypen DLA 2-5 und die MLC-Spezifität DLA 51. Der zweite Haplotyp von L 315 ist sowohl serologisch als auch in der MLC als DLA 3-12-53

zu erkennen. L 23 hingegen hat zwar mit L 315 DLA-A 3 gemeinsam, nicht aber das Antigen der zweiten Serie. Es wurde serologisch als DLA-B 6 oder 12 definiert. Dies bestätigt auch die MLC: L 23 stimuliert sowohl B 270 und L 315 als dies auch umgekehrt der Fall ist. (Figur V.3.)



Figur V.3. LD-Typisierung der Hunde L 23 und L 315

Wäre L 23 identisch mit L 315, dürfte in beiden Richtungen keine Stimulation stattfinden, außerdem dürfte B 270 als Stimulator L 23 nicht stimulieren.

Es ist also davon auszugehen, daß das Serum des Hundes L 23 gegen DLA 12 gerichtet ist, das von L 315 gegen die vorläufig nicht näher definierte Spezifität von L 23. Die Analyse mehrerer Familien, in denen der Haplo-
typ DLA 9-6 segregiert, zeigt, daß das Serum L 315 Antikörper gegen die Spezifität DLA-B 6 enthält (s. Tabelle V.1., Familie 5 und Tabelle V.2., Familie 2). In Tabelle V.6. sind Familien dargestellt, in denen die Seren L 23 und L 315 segregieren.

Zur weiteren Aufklärung der Spezifitäten DLA-B 6 und 12 tragen auch die Segregationsmuster der Seren D 16, D 17 und N 43 bei. Dazu wurden sie mit verschiedenen Zellen absorbiert, und die absorbierten mit den unabsorbierten Seren hinsichtlich ihrer Reaktionen verglichen.

Tabelle V.5. Segregation des Haplotypen 9-6

Familie 1

Seren	1	7	3	L	D	D	N	D	4	9	L		
	7	7	8	3	1	1	4	1	6	3	3		
	8			0	6	7	3	6			1		
				6				a			5		
DLA- Antigene	3				9				6			Haplotypen	Segregation
V: L 311	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-6/3-6	A B
M: L 307	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-6/3-6	C D
D 39					+	+	+	+	+	+	+	9-6/9-6	A C
D 40					+	+	+	+	+	+	+	9-6/9-6	A C
D 41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-6/3-6	A D o. B C
D 42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-6/3-6	A D o. B C
D 43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-6-/3-6	A D o. B C
D 44					+	+	+	+	+	+	+	9-6/9-6	A C
D 45					+	+	+	+	+	+	+	9-6/9-6	A C
D 46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9-6/3-6	A D o. B C

Familie 6

[illegible]

Fortsetzung Tabelle V.5.

Familien 19 und 32 (gemeinsame Eltern)

Seren	C	C	C	D	D	C	D	D	L	L	D	D	N		
	9	8	9	6	1	1	8	5	3	2	1	1	4		
	a				7	0		b	1	3	6	7	3		
	I				a				5						
DLA-															
Antigene	2	2 + 4			9	4	5	6	12	9 + 6 + 12				Haplotypen	Segregation
V: 5265	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	9-6/2-4	A B
M: N 41	+	+	+	+			+	+		+	+	+		2-5/b1-12	C D
N 157					+	@			+	+	+	+	+	9-6/b1-12	A D
N 158	+	+	+	+		+	+	+						2-4/2-5	B C
N 159	+	+	+	+		+				+	+	+		2-4/b1-12	B D
N 160	+	+	+	+		+				+	+	+		2-4/b1 12	B D
N 161	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	9-6/2-5	A C
N 162					+				0	+	+	+	+	9-6/b1-12	A D
N 163	+	+	+	+		+				+	+	+		2-4/b1-12	B D
N 231	+	+	+	+		+	+	+						2-4/2-5	B C
N 232					+				+	+	+	+	+	9-6/b1-12	A D
N 233	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	9-6/2-5	A C
N 234					+				+	+	+	+	+	9-6/b1-12	A D
N 235	+	+	+	+		+	+	+						9-6/2-5	A C
N 236	+	+	+	+		+	+	+						2-4/2-5	B C
N 237	+	+	+	+		+				+	0	0		2-4/x-12	B D
N 238	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	9-6/2-5	A C

Tabelle V.6. Segregation von Serum L 23 (anti-DLA 12)

Familie 8

Seren	D	D	D	N	D	N	L	C	D	D	C	L	C	L	6	
	1	1	1	4	4	4	3	9	1	5	1	3	1	2	5	
	6	6	7	3		3	1	a	8	b	0	0	1	3		
	a					a	5	I				6				
DLA- Atnigene	9	9 + 6			6			2	5		4	3	12			
		+12											Haplotypen			
													Segreg.			
V: P 615	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			9-6/2-5			A B
M: N 36		+	+					+			+	+	+	+	+	C D
C 7	+	+	+	+	+	+	+	+			+		9-6/2-4			A D
C 8	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	A C
C 10		+	+					+	+	+		+	+	+	+	B C
C 11	+	+	+	+	+	+	+	+			+		9-6/2-4			A D

Familie 30

Seren	L 3	L 2	D 1	D 1	C ⁺ 1	M 3	3 4	C 1	L 3
	0	3	6	7	1		3	1	2
	6				a		7		8
DLA- Antigene	3	12	9+6 +12		?	1+13		3+12	
								Haplotypen	Segregation
V: Omar 07	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M: Mia 08		+	0	0	+	+	+	+	+
N 219	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N 220					+	+	+		
N 221		+	+	+	+	+	+	+	+
N 222		+	+	+	+	+	+	+	+
N 223					+	+	+		
N 224	+	+	+	+	+	+	+	+	+
								3-12 1-13	A B
								b1-12 1-13	C D
								1-13 3-12	B D
								1-13 1-13	B D
								b1-12 1-13	B C
								b1-12 1-13	B C
								1-13 1-13	B D
								3-12 1-13	A D

+ zur Frage der Spezifität von C 11a s.u.

Serum N 43 mit den Spezifitäten DLA 9 + 6 wurde mit Zellen des Hundes 4198 D absorbiert, die die Spezifität DLA 9-4 in homozygoter Form tragen. Das absorbierte Serum N 43 a müßte also die Spezifität DLA-B 6 enthalten. Den Beweis dafür erbringen wiederum Familien, deren Zellen DLA 9 und DLA 6 in verschiedenen Kombinationen tragen (s. Fig. 3, Familie 4, Fig. 4, Familie 3 und Fig. 8, Familie 6). Ein weiterer Beweis ist die Reaktion des absorbierten Serums N 43 a mit den Zellen von L 23 (DLA 3-6/2-5). Ebenso wie N 43 in unabsorbierter Form reagierte N 43 a mit diesen Zellen (s.Fig. V.4.).

Serum N 43		
	unabsorbiert	absorbiert
ZELLEN 4198 D	+	-
L 23	+	+

Figur V.4. Reaktionen von N 43, unabsorbiert und absorbiert

Die Seren D 16 und D 17 - beide durch den Spender D 18 immunisiert - sollten ursprünglich lediglich die Spezifitäten DLA - A 9 und DLA - B 6 enthalten. Nach einer Reihe von Familientypisierungen stellte sich jedoch heraus, daß sie auch mit Zellen reagierten, die die Spezifität DLA-B 12 tragen (s.Fig. 8 und 9). Um die Art dieser Kreuzreaktion erklären zu können, wurden beide Seren mit Zellen von L 23 (DLA 3-6/2-5) und andererseits mit Zellen von B 270 (DLA 3-12/3-12) absorbiert.

Wenn die Kreuzreaktion zwischen DLA-B 6 und DLA-B 12 darauf beruhen würde, daß die Seren D 16 und D 17 nicht nur zwei Antikörper, gegen DLA 9 und DLA 6, sondern drei, gegen DLA 9, DLA 6 und DLA 12 enthielten, dann müßten die mit Zellen von B 270 absorbierten Seren noch mit Zellen von L 23 reagieren, die mit Zellen von L 23 absorbierten Seren noch mit Zellen von B 270. Beide Arten der Absorption führen aber dazu, daß die absorbierten Seren weder mit den Zellen von L 23, noch mit denen von B 270 reagieren, sondern lediglich mit Zellen, die die Spezifität DLA 9 in Zusammenhang mit einer anderen Spezifität des B-Locus tragen (hier wurde 4198 D ausgesucht, um die Unterschiede zu demonstrieren; s. auch Tab. V.1., V.5., V.6.).

		SEREN		absorbiert m. L23		abs. m. B 270	
		unabsorbiert					
		D 16	D 17	D 16	D 17	D 16	D 17
Z	L 23						
E	(3-6/2-5)	+	+	-	-	-	-
L	B 270						
L	(3-12/3-12)	+	+	-	-	-	-
L	4198 D						
E	(9-4/9-4)	+	+	+	+	+	+
N							

Figur V.5. Seren D 16 und D 17, absorbiert und unabsorbiert

Die Seren D 16 und D 17 enthalten also lediglich zwei DLA-Antikörper-Populationen, eine gegen DLA-A 9 und eine gegen DLA-B 6+12. Es existieren also zwei Untergruppen der Spezifität DLA - B6 : Eine Spezifität DLA-B 6+12 (hier repräsentiert durch die Seren D 16 und D 17) und eine Spezifität DLA 6 - 12 (hier repräsentiert durch Serum N 43).

Auch die Spezifität DLA-B 12 ist in zwei Unterspezifitäten zu unterteilen: DLA-B 12-6 und DLA-B 12 + 6. Dies zeigt ein Vergleich der Familien 10, 13 und 14 mit den Familien 11, 12 und 15. Serum L 23 (Anti- DLA 12) segregiert sowohl in den Familien 10, 13 und 14 als auch in den Familien 11, 12 und 15. Die Seren D 16 und D 17 (Anti 9,6 + 12) segregieren in den Familien 11, 12 und 15 nach demselben Muster wie L 23, in den Familien 10, 13 und 14 segregieren sie wie Serum N 43 und reagieren nicht mit Zellen, die die Spezifität DLA-B 12, nicht aber die Spezifität DLA-B 6 tragen. Die Familien 10, 13 und 14 besitzen also die Spezifität DLA-B 12-6, und die Familien 11, 12 und 15 die Spezifität DLA-B 12 + 6. (Figur V.7, V.8.)

Figur V.7. Die Spezifität DLA-B 12+6
Familie 11

SEREN	C 8	C 9	D 6	C 1	D 1	D 5	D 1	D 1	N 4	L 2	C 1	M 3 3 4 3 7
DLA- Antigene	2+4			4	5	9+6 +12		9, 6	12 12	3, 12	1,13	
											Haplotypen	
V: 917											3-12 3-5	A B
M: 024	+	+	+								3-13 2-5	C D
0126											3-5 3-13	B C
0127	+	+	+								3-12 2-5	A C
0129	+	+	+								3-5 2-5	B D
0130	+	+	+								3-12 2-5	A D
0132											3-13 3-5	B C

Familie 12

SEREN	C	C	D	C	D	D	D	D	N	L	C	M	3
	8	9	6	1	1	5	1	1	4	2	1	3	4
				0	8	b	6	7	3	3	1	3	7
DLA- Antigene	2 + 4		4		5		9 + 6		12	3, 12		1, 13	
							+ 12						

Familie 15

SEREN	C	C	D	C	D	D	D	D	N	L	C	M	3	
	8	9	6	1	1	5	1	1	4	2	1	3	4	
				0	8	b	6	7	3	3	1	3	7	
DLA- Antigene	2	+	4	4		5	9	+	6	12	3,	1,13		
							+	12			12			
	Haplotypen												Segregation	
V: DRO- 1613					+	+	+	+	+	+	+	+	9-12,b1-5 ⁺	A B
M: RI- 1314	+	+	+	+	+	+					+	+	2-5 ⁺ ,3-4	C D
R3-115	+	+	+	+			+	+	+	+	+		9-12,3-4	A D
R3-216	+	+	+		+	+					+	+	b1-5 ⁺ ,2-5 ⁺	B C
DR3-117	+	+	+		+	+					+	+	b1-5 ⁺ ,2-5	B C
DR3-218	+	+	+	+			+	+	+	+	+		9-12,3-4	A D
DR3-319	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	9-12,2-5 ⁺	A C

Tabelle V.8. Die Spezifität DLA-B 12-6

gene, so daß auch Antikörper der Spezifität DLA-B 6 mit Zellen, die den Haplotyp 9-4 in homozygoter oder heterozygoter Form tragen, reagieren.

Möglichkeit a wurde mittels eines Verdünnungstests und eines Absorptionstests ausgeschlossen.

Das Serum L 315 wurde in einer Verdünnungsreihe parallel mit Zellen von 4198 D (DLA 9-4/9-4) und mit Zellen von L 23 (DLA 3-6/2-5) getestet. Würde Serum L 315 neben seiner Hauptspezifität DLA-B 6 auch Antikörper gegen DLA 9 enthalten, so hätten diese Antikörper wesentlich niedrigere Titer als die Hauptantikörper. Da aber beide Titer gleich sind (nämlich 1:4), ist davon auszugehen, daß Antikörper der Spezifität DLA-A 9 in Serum L 315 nicht enthalten sind (Fig. V.6.)

Serum L 315 - Verdünnungen					
		unverd.	1:2	1:4	1:8 1:16
Z E L L E N	4198 D	100%	50%	10%	0 0
	L 23	100%	50%	10%	

lysierte
Zellen

Figur V.6.

Dieses Ergebnis wird bestätigt durch einen Absorptionstest. Das Serum L 315 wurde absorbiert einmal mit Zellen von 4198 D (9-4/9-4) und zum anderen mit Zellen von L 23 (3-6/2-5). Würde es sich um zwei verschiedene Antikörper handeln, müßte das mit 4198 D absorbierte Serum noch mit Zellen von L 23 reagieren und umgekehrt. Da aber in beiden Fällen keine Reaktion auftritt, wird das Ergebnis

der Verdünnungsreihe bestätigt, daß Serum L 315 keine Antikörper gegen DLA- A 9 enthält (Fig. V.7.).

Serum L 315

		unabs.	abs. mit 4198 D	abs. mit L 23
Z E L L E N	4198 D	+	-	-
	L 23	+	-	-

Figur V.7.

Die Frage, ob die Reaktion des Serums L 315 mit Zellen die den Haplotyp DLA 9-4 tragen, auf der Existenz eines weiteren Locus des DLA-Systems oder aber auf einer Änderung der chemischen Struktur der Antigene infolge der Homozygotie für DLA-A 9 beruht, kann nicht definitiv beantwortet werden. Gegen die Annahme, daß für DLA-A⁹ homozygote Zellen anders strukturierte Antigene tragen, spricht allerdings, daß andere Seren, die gegen DLA-B6 gerichtet sind, die erwähnte Reaktion nicht zeigen.

Würde Möglichkeit b zutreffen, so müßte der mögliche weitere Locus des DLA-Systems bzw. eines der möglichen Non-DLA-Systeme ein Antigen codieren, das hoch assoziiert ist mit einerseits dem Haplotypen DLA 9-4 und andererseits dem Haplotypen 3-6, da L 23 der Spender für die Immunisation von L 315 war. Für diese Möglichkeit spricht, daß auch Serum L 24 (anti-DLA-B6, Spender L 372 DLA 3-6, 3-12) mit Zellen des Haplotyps 9-4 reagiert (Familie 29).

SEREN	C	C	C	D	C	N	N	L	L
	9	8	9	6	1	4	6	3	2
	a	I			0	0	5	1	4
								5	
DLA-									
Antigene	2	2	+	4	4		9	6	
								Haplotyp	Segregation
V:4198 D		+	+	+	+	+	+	+	9-4 9-4
M:7382	+	+	+	+	+				2-4 2-4
D 53	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4 2-4
D 54	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4 2-4
D 55	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4 2-4
D 56	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4 2-4
D 57	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4 2-4
D 85	+	+	+	+	+	+	+	+	9-4 2-4
									A A
									C C
									A C
									A C
									A C
									A C
									A C

Tabelle V.9. Familie 29

Weitere Absorptionsversuchea) Kreuzreaktion zwischen DLA-A 2 und 9

Aus den Daten des "Joint Report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics" (25) ergeben sich Anhaltspunkte für die Existenz einer Kreuzreaktion zwischen DLA-A 2 und DLA-A 9. Um festzustellen, ob die Sera, die für diese Arbeit verwendet wurden, auch solche Kreuzreaktionen enthalten, wurden die Seren C 8 und C 9 (beide Anti-DLA 2-4) mit Zellen des Hundes 4198 D (9-4/9-4) absorbiert, und die so absorbierten Seren in den Familienanalysen den nicht-absorbierten Seren gegenübergestellt. In den Familien, die in diesem Kapitel bisher aufgeführt sind,

konnten solche Kreuzreaktionen nicht entdeckt werden. Bestünden Kreuzreaktionen, dann dürften die absorbierten Seren keine Reaktionen mehr zeigen, da davon auszugehen ist, daß die Kreuzreaktionen durch ein-und denselben Antikörper (hier DLA-A 2) hervorgerufen werden. Es handelt sich also bei den Seren C 8 und C 9 um Seren, die diese Kreuzreaktion nicht zeigen.

b) Die Spezifität DLA 1

Die Tatsache, daß die Spezifität DLA-A 1 fast immer nur in einem Haplotypen mit der Spezifität DLA-B 13 auftritt, läßt die Frage auftreten, ob diese Spezifität tatsächlich existiert. Um diese Frage aufzuklären, wurde Serum 3437 mit Zellen des Hundes WX 37 (DLA 8-13/8-13) absorbiert. Würde die Spezifität DLA-A 1 tatsächlich existieren, müßte das absorbierte Serum 3437 noch mit Zellen reagieren, die den Haplotypen DLA 1-13 tragen, z.B. mit den Zellen der Hunde Omar (07), Dora (N 102) oder L 17 (Referenzhund für die MLC-Spezifität 56). Da dies aber nicht der Fall ist, was auch die Familien beweisen, die den Haplotypen DLA 1-13 besitzen, muß die Spezifität DLA-A 1 in Frage gestellt werden.

		Serum 3437	absorbiert
Z E L L E N	WX 37	+	-
	Omar	+	-
	Dora	+	-
	L 17	+	-

Figur V.8.

c) Absorption des Serums C 11 (Anti 3-12)

Serum C 11 zeigt in allen Familien, die den Haplotypen DLA 1-13 besitzen, positive Reaktionen mit Zellen, die diesen Haplotyp tragen, lysiert aber nur 50% der Zellen. Es muß also neben seinen Antikörpern gegen DLA-A 3 und DLA-B 12 noch andere Antikörper enthalten. Serum C 11 wurde absorbiert mit Zellen von L 372 (3-12/3-6), so daß es keine Antikörper gegen die Antigene 3 und 12 enthält. Das so absorbierte Serum segregiert nach demselben Muster wie die Seren 3437 und M 3 (beide anti-1,13). (Tabelle V.10.)

Familie 27

SEREN	3	L	N	N	L	L	C	L	C	M	3	
	4	3	4	6	3	2	1	3	1	3	4	
	3	0	0	5	1	3	1	2	1		3	
	7	6			5			8	a		7	
	a											
DLA-												
Antigene	(1)	3		9	6	12	3,12	?	1+13	Haplotypen		Segregation
V:Omar 07		+				+	+	+	+	+	3-12 1-13	A B
M:L 378		+	+	+	+		+	+			9-6 3-b1	C D
N 193			+	+	+		@		+	+	1-13 9-6	B D
N 194			+	+	+		@		+	+	1-13 9-6	B D
N 195		+	+	+		+	+	+			3-12 9-b1	A D
N 197		+	+	+	+	+	+	+			3-12 9-6	A C
N 198		+	+	+	+	+	+	+			3-12 9-6	A C
N 199			+	+	+				+	+	1-13 9-6	B C
N 200		+	+	+		+	+	+			3-12 9-b1 ⁺	A C
N 201		+	+	+	+	+	+	+			3-12 9-6	A C

+ cross-over (s.u.)

Familie 28

SEREN	C C	C C D	D ⁺ D ⁺ D	C M 3	
	9 8	8 9 6	8 1 5	1 3 4	
	a II	I	8 b	1 3	
				a 7	
DLA- Antigene	2	2 + 4	5	? 1+13	Haplotypen Segregation
V:Tasso	+ +	+ + +			2-4 2-4 A A
M:Dora N 102	+ +	+ +	+ + +	+ + +	2-5 1-13 C D
N 214	+ +	+ +	⊗ ⊗	+ + +	2-4 1-13 A D
N 215	+ +	+ + +	+ + +		2-4 2-5 A C
N 216	+ +	+ +	⊗ ⊗	+ + +	2-4 1-13 A D
N 217	+ +	+ + +	+ + +		2-4 2-5 A C

Tabelle V.10 Segregation des Serums C 11 a in zwei Familien mit dem Haplotyp DLA 1-13

+ ⊗ bei D 8 + D 18 = DLA 5+13

Serum C 11 enthält also neben seinen Antikörpern gegen die Spezifitäten DLA 3 und 12 auch solche gegen die Spezifität 1 + 13 oder Antikörper gegen einen weiteren SD-Locus des DLA-Systems, der mit DLA 1-13 hoch assoziiert ist.

Crossing - over

In einem bestimmten Prozentsatz aller Meiosen finden zwischen zwei Loci eines Chromosoms Chromosomenbrüche statt; bei der Wiederverschmelzung können die beiden Bruchstücke der homologen Chromosomen vertauscht werden (crossing-over). Die Häufigkeit des crossing-overs zwischen zwei Loci ist

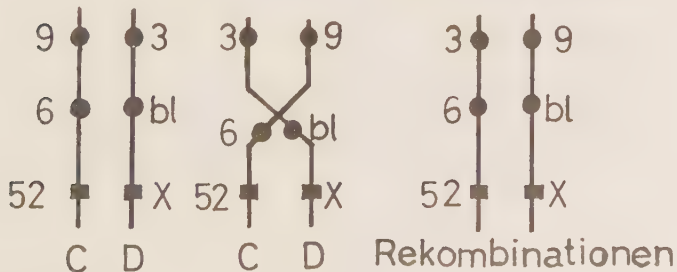
dabei im Allgemeinen der Entfernung der beiden Loci proportional. Somit ist das Auftreten von crossing-overs der beste Beweis für die Hypothese zweier getrennter DLA-Loci, bzw. von drei Loci, wenn man den LD-Locus in die Betrachtung miteinbezieht.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Familie 27 ein crossing-over zwischen den Chromosomen der Mutter L 378 festgestellt.

Tabelle V.11.

DLA-Antigene	1	3	9	6	12	13	Haplotypen	Segregation
Omar. D07	+	+			+	+	1-13/3-12	A B
MizziL378		+	+	+			9-6/3-X	C D
N 193	+		+	+		+	1-13/9-6	A C
N 194	+		+	+		+	1-13/9-6	A C
N 195		+	+	0	+		3-12/9-X	B+ cross-over
N 197		+	+	+	+		3-12/9-6	B C
N 198		+	+	+	+		3-12/9-6	B C
N 199	+		+	+		+	1-13/9-6	A C
N 200		+	+	0	+		3-12/9-X	B+ cross-over
N 201		+	+	+	+		3-12/9-6	B C

Es fand also zwischen den beiden Chromosomen von L 378 ein crossing-over zwischen den DLA-Loci A und B statt. Das eine der beiden neuen Chromosomen, nämlich die Rekombination 9-bl, haben die beiden Nachkommen N 195 und N 200 erhalten. Eine schematische Darstellung des crossing-over der Chromosomen von L 378 zeigt Figur V.9.



VI. Die Verteilung der DLA-Antigene in einer Population unverwandter Hunde

In der Population einer bestimmten Hundezucht kommen nur bestimmte Antigene vor, die durch Immunisierungsversuche und Familienanalysen leicht definierbar sind (s. Kapitel V). Um die Häufigkeit von bisher unbekannten Antigenen (= blank) feststellen zu können, ist es notwendig mit Hilfe statistischer Methoden Typisierungsergebnisse von unausgewählten und unverwandten Hunden verschiedener Rassen zu untersuchen. (11,29,57). Zur Typisierung dieser Hunde wurden die in den Familienanalysen hinsichtlich ihrer Spezifitäten definierten Antiseren verwendet. Es wurden 123 verschiedene unverwandte Hunde typisiert, wobei die Eltern der in Kapitel V beschriebenen Familien -soweit sie nicht verwandt waren- miteinbezogen wurden.

Von den 123 Hunden stammen

- 11 aus der Zucht Gassner in Sulzfeld
- 24 aus dem Institut für experimentelle Chirurgie der Universität München, das sie von einem Versuchstierhändler bezogen hat
- 48 aus dem Patientengut der Medizinischen Tierklinik der Universität München
- 20 aus der Hundezucht der Gesellschaft für Strahlenforschung München/Neuherberg
- 20 aus dem Institut für experimentelle Chirurgie der Universität Rotterdam/Niederlande (diese Hunde wurden anlässlich eines "Workshops" im Sommer 1975 in Rotterdam typisiert.)

Antigene des 1. Locus

Tabelle VI.1. zeigt die Frequenzen für jedes Antigen der Serie des 1. Locus. Die Genotyp-Frequenzen werden aus den Phänotypdaten nach folgender Formel berechnet:

$$g = 1 - \sqrt{1-f}$$

dabei ist g die Genotypfrequenz, f die Phänotyp-Frequenz, die sich durch den Quotienten aus der absoluten Anzahl der jeweils erkannten Antigene und der Gesamtzahl N aller untersuchten Hunde errechnet.

DLA-Antigen	Phänotypfrequenz		Genotypfrequenz
	Absolut	Relativ	
1	13	0,106	0,055
2	56	0,455	0,262
3	34	0,276	0,149
7	23	0,187	0,098
8	17	0,138	0,072
9	46	0,374	0,209
10	6	0,049	0,025

Tabelle VI.1 Frequenzen der Antigene des 1. Locus für eine Stichprobe von 123 unverwandten Hunden ($N=123$)

Addiert man die gefundenen Genfrequenzen aller bekannten Antigene und subtrahiert diese Summe von 1, so erhält man die Genotypfrequenz aller unbekannten Antigene (blank-Allele):

$$g_{b1} = 1 - 0,87 = 0,130$$

Dies bedeutet, daß ca 13% aller Antigene des 1. Locus noch undefiniert sind. Bei zufallsbedingter Auswahl von unverwandten Individuen einer ausgezüchteten Population (random-mating) stellt sich für die Allele eines Locus ein Gleichgewicht ein, das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, für das aus den Genotypdaten Erwartungswerte errechnet werden können, die in einem einfachen Chi-Quadrat-Test mit den tatsächlich beobachteten Werten verglichen werden.

Die Berechnung der Erwartungswerte erfolgt nach folgenden Formeln:

Für die Anzahl der für zwei bekannte Antigene a und b Heterozygoten $E(a/b) = g_a \times g_b \times 2 \times N$

wobei $E(a/b)$ der Erwartungswert für die Anzahl der für die beiden Allele a und b Heterozygoten, g_a und g_b die Genotyp-Frequenzen für die Allele a und b sind, und N der Probengröße entspricht.

Für Homozygote $E(a/a) = g_a^2 \times N$

Individuen, deren Phänotyp nur ein Antigen aus einer Serie aufweist, können entweder für dieses Antigen homozygot sein oder aber heterozygot (z.B. DLA 1/blank oder DLA 1/1). Der Erwartungswert für solche Individuen muß gleich der Summe der Erwartungswerte für homozygote und heterozygote mit einem unbekannten Antigen sein:

$$E(a - \text{blank}) = g_a^2 \times N + g_a \times g_{\text{blank}} \times 2 \times N$$

Um die beobachteten und die erwarteten Werte miteinander vergleichen zu können, wird ein einfacher Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Seine Berechnung erfolgt durch folgende Formel:

$$\text{Chi - Quadrat} = \frac{(\text{beobachtet} - \text{erwartet})^2}{\text{erwartet}}$$

Um die Übereinstimmung der Werte aller Allele eines Locus zu vergleichen, werden die einzelnen Chi-Quadrate zu einem Gesamt-Chi-Quadrat für den betreffenden Locus addiert. Die Anpassung ("fit") wird durch einen p-Wert ermittelt, der anhand des Gesamt-Chi-Quadrates und der Anzahl der Freiheitsgrade aus einer statistischen Tabelle zu ersehen ist (Geigy Tabellen). Die Anzahl der Freiheitsgrade v errechnet sich nach folgender Formel:

$$v = n - 1 - k$$

wobei n die Anzahl der Vergleiche darstellt, und k die Anzahl der zur Berechnung der Erwartungswerte verwendeten Gen-Frequenzen. Bei p -Werten von 0,1 oder höher ist die zugrunde gelegte Hypothese bestätigt.

Tabelle VI.2 zeigt den Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die Allele des 1. Locus.

Tabelle VI.2 Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die Antigene d. ersten DLA-Locus ($N = 123$)

Art der Heterozygoten	Anzahl Beobachtet	Erwartet	Chi-Quadrat
b1-b1	4	2,079 a	
b1- 1	3	2,131 a	1,847 a
b1- 2	17	16,820	0,002
b1- 3	7	7,496	0,033
b1- 7	4	4,315	0,023
b1- 8	1	2,941 b	
b1- 9	10	12,057	0,351
b1-10	1	0,877 b	
1- 2	3	3,545 b	1,513 b
1- 3	3	2,016 c	
1- 7	0	1,326 c	
1- 8	0	0,974 c	0,401 c
1- 9	4	2,828 d	
1-10	0	0,338 d	
2- 3	8	9,603	0,268
2- 7	7	6,316	0,074
2- 8	8	4,641	2,431
2- 9	12	13,470	0,160
2-10	1	1,611 d	0,010 d
3- 7	2	3,592 e	

Fortsetzung Tabelle VI.2

Art der Heterozygoten	Anzahl Beobachtet	Erwartet	Chi-Quadrat
3- 8	3	2,639 e	0,243 e
3- 9	9	7,661	0,234
3-10	2	0,916 f	
7- 8	1	1,736 f	
7- 9	8	5,039	1,740
7-10	1	0,603 f	
8- 9	3	3,702 g	
8-10	1	0,443 g	0,005 g
9-10	0	1,285 f	0,064 f
Gesamt	123	123,000	9,399
p = 0,4 v = 9			

Indices: a - g: Zusammenfassung (Erwartungswerte unter 4 werden als statistisch nicht signifikant gewertet).

Der Anpassungswert p, der gleich 0,4 ist, bestätigt zum einen, daß alle aufgeführten Antigene dem 1. DLA-Locus angehören, zum anderen, daß die untersuchte Population das Produkt einer zufallsbedingten Auswahl der Geschlechtspartner in der Eltern-Generation ist (random mating). Außerdem ist der sehr gute "fit" ein deutlicher Hinweis für die Qualität der serologischen Definition der Antigene.

Antigene des Zweiten DLA-Locus

Mit denselben statistischen Verfahren wie im Abschnitt über die Antigene des Ersten DLA-Locus wurde der Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die Antigene des Zweiten DLA-Locus durchgeführt.

Tabelle VI.3 zeigt die Phänotyp-Frequenzen und die daraus nach der Formel $g = 1 - \sqrt{1-f}$ errechneten Genotypfrequenzen für die einzelnen Antigene des zweiten Locus (N=123)

DLA-Antigen	Phänotyp-Frequenz		Genotypfrequenz (g)
	Absolut	Relativ (f)	
DLA 4	36	0,293	0,159
DLA 5	44	0,358	0,199
DLA 6	30	0,244	0,131
DLA 12	31	0,252	0,135
DLA 13	38	0,309	0,169
Blank			0,207

Daraus ist ersichtlich, daß etwa 20 Prozent der Antigene des zweiten DLA-Locus noch nicht serologisch erkennbar sind.

Tabelle VI.4 zeigt den Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die Antigene des Zweiten DLA-Locus (N=123)

Tabelle VI.4

Art der Heterozygoten	Beobachtet	Erwartet	Chi-Quadrat
B1/B1	10	5,270	4,245
B1/ 4	10	11,206	0,129
B1/ 5	12	15,004	0,601
B1/ 6	10	8,782	0,169
B1/12	6	9,116	1,065
B1/13	9	12,119	0,803
4/ 5	7	7,784	0,079
4/ 6	8	5,124	1,614

Fortsetzung Tabelle VI.4

Hetero- zygoten	Beobachtet	Erwartet	Chi-Quadrat
4/12	3	5,280	0,985
4/13	8	6,610	0,292
5/ 6	5	6,413	0,311
5/12	11	6,609	2,917
5/13	9	8,272	0,064
6/12	3	4,351	0,419
6/13	4	5,446	0,384
12/13	8	5,613	1,015
Gesamt	123	123,000	15,092
$v = 10 \quad p = 0,16$			

Im Vergleich zum Anpassungstest für die Antigene des Ersten DLA-Locus zeigt sich hier also eine wesentlich schlechtere Anpassung. Gleichwohl wird die zugrunde liegende Hypothese bestätigt, daß die aufgeführten Antigene Allele des Zweiten Locus sind. Der Grund für das wesentlich schlechtere Ergebnis des Anpassungstests für die Antigene des Zweiten Locus ist einmal in der vergleichsweise hohen Genfrequenz des Blank-Allels⁵ zu suchen, zum anderen in den verschiedenen Kreuzreaktionen der Antigene des zweiten Locus. Für die zukünftige Erforschung der Histokompatibilitäts-Antigene des Hundes ist also die genauere Definition der Antigene des zweiten Locus eine besondere Aufgabe.

VII. Diskussion

Mikrozytotoxizitätstest

Der im Kapitel Methodik angegebene Mikrozytotoxizitätstest ist in mehreren Variationen möglich:

Zum einen als sog. One-Stage-Test, d.h. es findet nur eine Inkubation statt: Zellen und Komplement werden von Anfang an gemeinsam mit dem Serum 60 Minuten lang inkubiert; zum anderen als Two-Stage-Test mit zwei Inkubationen, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde. Der Grund für die allgemeine Anwendung des Two-Stage-Test (= NIH, = Terasaki-Test) (50) ist in seiner höheren Empfindlichkeit zu suchen. Aufgrund der ersten Inkubation von Serum und Zellen wird im Two-Stage-Test eine vollständige Anlagerung der Antikörper an die Antigene der Zelloberfläche ermöglicht, während beim One-Stage-Test durch die gemeinsame Inkubation von Zellen, Serum und Komplement möglicherweise ein Inhibitionseffekt des Komplements zum Tragen kommt (1).

Neben diesen Variationen wird die Empfindlichkeit des Tests aber sicher noch von anderen Faktoren beeinflusst, z.B. von der Reaktivität des Komplements. Die Problematik der Verwendung verschiedener Variationen des NIH-Tests kam besonders bei den beiden bisherigen Workshops (30,31) zum Ausdruck. Einige der beteiligten Labors erzielten nämlich zu viele positive und andere zu viele negative Reaktionen. Nach dem zweiten Workshop wurde daher vereinbart, bis zum dritten Workshop im April 1977 einen einheitlich standardisierten Test auszuarbeiten, um zukünftig besser vergleichbare Daten zu erzielen. Die Vorarbeit dazu wurde auf einem Treffen in Rotterdam im Sommer 1975 geleistet.

Verdünnung von Seren

Um die Antikörper-Titer von Seren zu ermitteln, müssen diese in einer Verdünnungsreihe getestet werden, und zwar mehrmals mit den Lymphozyten einer Reihe von Hunden, um reproduzierbare Daten zu erhalten. Zunächst wurden diese Verdünnungen mit normalem Hundeserum vorgenommen, d.h. Serum ohne DLA-Antikörper, da davon auszugehen war, daß dies das beste Medium für Antikörper ist. Es zeigte sich jedoch sehr schnell, daß die so erzielten Ergebnisse nicht reproduzierbar waren und erheblichen Schwankungen unterlagen.

Dies beruht möglicherweise auf einem Anti-Komplement-Effekt des Normal-Serums. Daher wurde bei den Verdünnungsreihen als Verdünnungsmedium Hank'sche Lösung gewählt, da diese den Anti-Komplement-Effekt nicht aufweist. Mit dieser Verdünnungsweise konnten reproduzierbare Daten erzielt werden.

Immunisierung

Die Gewinnung von zytotoxischen Antiseren ist bei Laborieren leichter als beim Menschen durchzuführen, da die zeitraubende Suche nach Seren mit zytotoxischen Antikörpern von multiparen Schwangeren (46) fortfällt.

Es kann allerdings nicht übersehen werden, daß es immer noch keine allgemein anerkannte optimale Methode zur Produktion von Antiseren gibt.

Bei der Immunisierung durch Haut- oder andere Transplantate besteht der Vorteil, daß nach relativ kurzer Zeit eine Abstoßung und somit Produktion von Antikörpern erfolgt. Dies ist aber mit dem Nachteil verbunden, daß in vielen Fällen multispezifische und somit unbrauchbare Seren entstehen.

Die zur Zeit wohl beste Methode zur Immunisierung besteht

in der Immunisierung durch Vollblut oder Buffy-Coat. Dies wird bestätigt durch Freiwilligen-Versuche am Menschen, die von Ferrara et al. (22) durchgeführt wurden. Mit wöchentlichen Injektionen von etwa 20 ml Vollblut erzielten sie nach längerer Immunisierung Seren mit sehr "engem" Reaktionsmuster, die als operationell monospezifisch angesehen werden können. Um die in Kapitel VI errechneten Genfrequenzen für die Blank-Allele der beiden DLA-Loci zu definieren, müssen in verstärktem Maß Immunisierungen in und zwischen verschiedenen Hunderassen vorgenommen werden, da davon auszugehen ist, daß im Rahmen der Evolution innerhalb jeder einzelnen Rasse nicht alle DLA-Antigene vorhanden sind. Denn zum einen dürften die bei Beagles, die ja in dieser Studie als Spender und Empfänger verwendet wurden, vorkommenden Haplotypen bei anderen Rassen in anderen Kombinationen auftreten, zum anderen sind vermutlich die meisten bei Beagles vorkommenden Antigene durch die konsequenten intrafamilialen Immunisierungen bereits entdeckt (s. dazu auch 17 und die beim Menschen untersuchten Zusammenhänge zwischen Rasse und Frequenz der HLA-Antigene in 2).

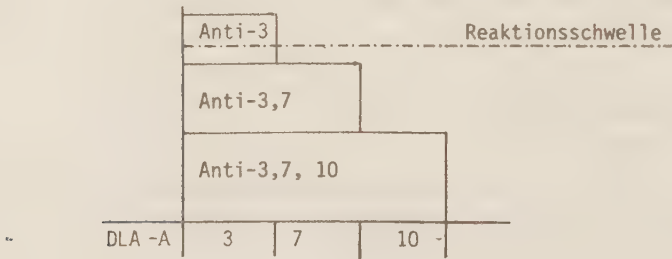
Absorption von Seren

Die Absorption von Seren wurde in dieser Arbeit vor allem durchgeführt, um die Definition verschiedener Antigene zu bestätigen, um Kreuzreaktionen aufzuklären und um aus Seren mit zwei oder mehr Spezifitäten monospezifische Seren zu gewinnen (s. Kapitel V). Wichtigstes Ergebnis der Absorptionsstudie ist die Etablierung der Spezifität DLA-B 6+12. Es konnte gezeigt werden, daß die Seren mit dieser Spezifität "supertypische" Antikörper enthalten, wie

sie auch im HLA-System vorkommen (3,38,39).

Die im DLA-System beobachteten Kreuzreaktionen können in Analogie zu den Befunden im HLA-System folgendermaßen erklärt werden:

Das DLA-Molekül besitzt -wie viele andere Polypeptidketten- eine Reihe verschiedener antigenen Determinanten, gegen die Antikörper gebildet werden können. Eine dieser Determinanten ist mehr oder weniger immunodominant und charakteristisch für das Antigen. Die weiteren Determinanten finden sich in einer Gruppe von verschiedenen Antigenen wie z.B. DLA-A 3,7 und 10. Bei länger dauernder Immunisierung werden diese "supertypischen" Antikörper mehr und mehr dominant im Reaktionsmuster eines Antiserums. Durch Absorptions- und Elutionsuntersuchungen weiß man, daß praktisch jedes Serum eine Mischung von verschiedenen Antikörper-Populationen darstellt, die an verschiedenen Stellen (= antigenen Determinanten) des gleichen DLA-Moleküls angreifen und die sich in ihrer zytotoxischen Wirkung addieren. Schematisch läßt sich das wie folgt darstellen:



Aus diesem Schema läßt sich leicht ablesen, daß die Absorption eines anti -DLA-A3 -Antiserums mit DLA-A 7 positiven Zellen die beiden supertypischen Antikörper-Populationen (Anti-3,7 und 3,7, 10) entfernt.

Der verbleibende Anti-DLA-A3- Antikörper fällt dadurch unter die Reaktionsschwelle und das Serum wird negativ. Dies zeigt, daß Absorptionen in diesem System keine Information über die "Monospezifität" von Antiseren liefern können.

Wie in den Versuchen mit den anti-9,6 - Antikörpern gezeigt wurde, lassen sich Antikörper gegen Antigene verschiedener Loci sehr wohl durch gezielte Absorption trennen.

Die genetische Begründung für die Kodierung supertypischer Spezifitäten kann gesucht werden in der Existenz einer Zahl von Mutationsstellen innerhalb des DLA-Gens, wie dies von Albert, Mickey und Terasaki postuliert wird (3).

Die eng begrenzten Spezifitäten DLA-B 6 und DLA-B 12 würden also von ähnlich aufgebauten Allelen des Locus B kodiert, die supertypische Spezifität DLA-B6+12 entspricht den diesen Allelen gemeinsamen Antigen-Determinanten. Als weitere supertypische Spezifität ist die Spezifität DLA-B5+13 anzusehen, die in den beiden bisherigen Workshops gut definiert wurde (30,31).

Durch Absorption nicht befriedigend aufzuklären ist die Reaktion von Serum L 315 (Anti-DLA-B6 mit Lymphozyten, die für den Haplotyp DLA 9-4 homozygot sind. Die Tatsache, daß andere Anti-DLA-B 6 Antiseren nicht mit DLA 9-4 homozygoten Zellen reagieren, weist darauf hin, daß das Serum L 315 offensichtlich Antikörper einer breiteren Spezifität enthält. Ähnliche Phänomene wurden auch im HLA-System beobachtet, allerdings noch nicht näher untersucht.

VIII. Die klinische Bedeutung der DLA-Strukturen

Die DLA-Strukturen wurden zunächst im Zusammenhang mit Knochenmarkstransplantationen untersucht (21). In diesem Zusammenhang, aber auch bei Nierentransplantationen, wird momentan ihre klinische Bedeutung untersucht, was, nachdem sich die Kenntnisse über die DLA-Strukturen in den letzten Jahren stark erweitert haben, in genau geplanten Experimenten möglich ist.

Die Gewebeverträglichkeit muß gerade bei Knochenmarkstransplantationen besonders beachtet werden, da es sich um die Übertragung von immunkompetenten Zellen handelt, so daß die Abstoßungsreaktion nicht nur des Empfängers gegen das Transplantat in Betracht zu ziehen ist (Host versus Graft HvG), sondern auch die des Transplantats gegen den Empfänger (GvH).

Die Abstoßungsreaktionen werden am Hund deshalb auch intensiv untersucht (34, 35, 36, 47, 48, 56), seit kürzerer Zeit auch unter dem Gesichtspunkt gezielter Donor-Recipient-Kombinationen.

So kann jeweils die Bedeutung der Produkte der einzelnen Loci des MHC des Hundes genau erforscht werden.

Es werden gezielt die Grade der Inkompatibilität so geändert, daß jeweils nur eine Inkompatibilität für ein Antigen jeweils eines Locus besteht (35) oder die Zellen eines für bestimmte Antigene homozygoten Donors werden in einen heterozygoten, aber auf einem Chromosom mit dem Donor identischen Empfängers transplantiert (34).

Die bisher bei diesen Untersuchungen erzielten Ergebnisse bestätigen, daß das DLA-System tatsächlich der Hauptkomplex des Hundes für die Gewebeverträglichkeit (MHC) ist. Im MHC sind aber neben den drei bisher erkannten drei Loci noch andere für die Gewebeverträglichkeit verantwortliche Loci vorhanden. Dies wird bestätigt durch die Tatsache, daß DLA-identische Geschwister bessere Donor-Recipient-Kombinationen für die Transplanta-

tionen darstellen als DLA-identische unverwandte Kombinationen. Schließlich ist durch die bisherigen Untersuchungen im Rahmen von Knochenmarkstransplantationen auch die Existenz von nicht DLA-gekoppelten bzw. auf anderen Chromosomen befindlichen Gewebeverträglichkeitskomplexen (=Minor Histocompatibility Complexes) bestätigt worden.

IX. Zusammenfassung

Der Zusammenhang zwischen Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) und Leukozyten-Iso-Antigenen ist seit 1946 bekannt (37). Da der Hund ein gutes Modell für die Histokompatibilität des Menschen darstellt (4), wurde sein Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (=MHC = DLA) mit Hilfe serologischer (Mikrozytotoxizitätstest) und zellulärer Methoden (Gemischte Leukozytenkultur = MLC) untersucht. Aufbauend auf die Resultate der beiden bisherigen Internationalen Workshops über die Immunogenetik des Hundes werden in der vorliegenden Arbeit weitere Untersuchungen über das DLA-System angestellt.

Zur Untersuchung der zytotoxischen Reaktionen zwischen Lymphozyten und Antiseren wurde der von Terasaki entwickelte NIH-Mikrozytotoxizitätstest (MCT) (50) als Two-Stage-Test verwendet. Diese Variation ist empfindlicher als ein One-Stage-Test, da Antigen und Antikörper sich vollständig vor der Zytolyse verbinden können. Im One-Stage-Test besteht diese Möglichkeit nicht, da Serum, Zellen und Komplement von Anfang des Tests an gemeinsam inkubiert werden.

Durch gezielte Immunisierung mittels Hauttransplantaten, Vollblut oder Buffy-Coat wurden 33 Antiseren produziert. Es stellte sich heraus, daß die Immunisierung mit Vollblut oder Buffy-Coat Seren mit engeren Reaktionsmustern erbrachte als die Immunisierung durch Hauttransplantate. Sechs Hunde entwickelten nur sehr schwache Antiseren, sieben Seren waren zu multispezifisch. Für die weiteren Untersuchungen verwendbar waren die Seren von 20 Hunden. Durch Verdünnungsreihen wurden die Antikörper-Titer der einzelnen Seren bestimmt. Dabei wurde als Verdünnungsmedium Hank'sche Lösung verwendet, da sich herausstellte, daß Normal-Hundeserum als Verdünnungsmittel einen

Anti-Komplement-Effekt aufweist.

Mit den zwanzig Seren und Seren der beiden Workshops wurden 33 Hundefamilien untersucht und deren Immunogenetik aufgeklärt. Dabei wurde in einer Familie ein Crossing-Over zwischen Antigenen des ersten und des zweiten Locus festgestellt, was als Beweis für die Existenz getrennter Loci zu werten ist. Durch Vergleiche zwischen verschiedenen Familien konnten die Spezifitäten einiger Seren mit bisher schlecht definierten Antigenen festgelegt werden, insbesondere der Seren L 306 (Anti-DLA-A3), L 315 (Anti-DLA-B6) und L 23 (Anti-DLA-B12).

Durch Absorptionsuntersuchungen wurden neue Erkenntnisse über die kreuzreagierenden Spezifitäten DLA-B 6 und DLA-B 12 gewonnen. Kreuzreaktionen zwischen Spezifitäten eines Locus treten aufgrund ähnlicher molekularer Strukturen dieser Spezifitäten auf, die zu einer Mischung von Antikörpern, die gegen gemeinsame Antigen-determinanten der kreuzreagierenden Spezifitäten gerichtet sind, führen. DLA-Antiseren müssen also als Mischungen von Antikörpern verstanden werden, die sowohl gegen die spezielle Antigen-determinante eines Antigens, als auch gegen die diesem Antigen mit anderen Antigenen gemeinsamen Determinanten gerichtet sind. Dies führt zu Schwierigkeiten bei der Absorption von kreuzreagierenden Antikörpern. Die Absorptionsuntersuchung von Serum L 315 (Anti-DLA-B 6), das auch mit DLA 9-4 homozygoten Zellen reagiert, ergab, daß dieses Serum ebenfalls supertypische Antikörper enthält, möglicherweise sogar solche, die gegen Antigene anderer Systeme als des MHC gerichtet sind. Die im zweiten Workshop (31) beschriebenen Kreuzreaktionen zwischen DLA-A 2 und DLA-A 9 konnten in der untersuch-

ten Population nicht bestätigt werden. Während eine Trennung von Antikörpern gegen kreuzreagierende Spezifitäten eines Locus durch Absorption nicht befriedigend erfolgen kann, sind Antiseren mit Antikörpern gegen die Antigene verschiedener Loci durch gezielte Absorption in ihre einzelnen Komponenten aufzuteilen, wie bei Antiseren mit den Spezifitäten DLA-A9 und B6 bzw. Antiseren mit den Spezifitäten DLA-A2 und B4 nachgewiesen wurde. Eine Trennung der Spezifitäten DLA-A 1 und DLA-B 13 gelang nicht, so daß die Existenz des Antigens DLA-A 1 in Frage gestellt werden muß.

Die Typisierungsergebnisse einer zufällig ausgewählten Population von 123 unverwandten Hunden wurden mittels statistischer Methoden ausgewertet. Der Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ergab für die Antigene des ersten Locus einen Anpassungswert (= fit) von $p=0,4$, für die Antigene des zweiten Locus war $p=0,16$. Die Antigene des ersten Locus sind also besser definiert als die Antigene des zweiten Locus. Die Auswertung der Genfrequenzen ergab, daß 13% der Antigene des ersten und 20% der Antigene des zweiten Locus noch nicht definiert sind. Die Aufklärung dieser sog. Blank-Allele wird nur durch eine konsequente Immunisierung zwischen Hunden verschiedener Rassen erfolgen können, da innerhalb der einzelnen Rassen im Vergleich zur Gesamtspezies hohe Kopplungsungleichgewichte zwischen den verschiedenen Antigenen bestehen.

Die Existenz des MHC beim Hund wird durch Versuche mit Knochenmarkstransplantationen bestätigt. In seiner klinischen Bedeutung wurde der MHC des Hundes durch gezielte experimentelle Anordnungen verschiedener Donor-Recipient-Kombinationen untersucht. Ein Vergleich zwischen Donor-Recipient-Kombinationen DLA-identischer Geschwister mit Kombinationen DLA-identischer unverwandter Hunde zeigt

die Existenz weiterer nicht mit dem DLA-System gekoppelter Histokompatibilitätskomplexe. Diese können nur durch weitere gezielte Immunisierungen aufgeklärt werden.

X. Danksagungen

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater danken, Herrn Privatdozenten Dr. E. D. Albert. Er hat mich durch seine Geduld bei der Diskussion der Ergebnisse, bei der Erörterung neuer Versuche und bei der Korrektur immer wieder ermutigt.

Seinen Mitarbeitern Frä. A. Andreas, Frau Dr. B. Kuntz, Frä. G. Pretorius, Frau B. Schießl, Herrn Dr. S. Scholz und Frau H. Wetz Müller habe ich die Aneignung der notwendigen praktischen Fertigkeiten für eine tägliche Routine zu verdanken und durch die freundschaftliche Laboratmosphäre den notwendigen Spaß an der Arbeit.

Herrn Dr. H. J. Kolb, Frau Dr. I. Rieder und Herrn Dr. J. Abbdanke ich für die Zusammenarbeit beim Immunisieren der Hunde und den Familienuntersuchungen, dem Tierpflegerin Ina Neuberger für ihre Unterstützung beim Blutabnehmen, Herrn Dr. H. Grosse-Wilde für die freundliche Überlassung der MLC-Daten.

Schließlich habe ich zu danken Frau Dr. S. Geyer und ihren Mitarbeitern von der Medizinischen Tierklinik der Universität München und Herrn Prof. Dr. Messmer vom Institut für Experimentelle Chirurgie, ohne deren Unterstützung die Untersuchung über die DLA-Antigene einer unverschnittenen Rattepopulation nicht zustande gekommen wäre.

Dem "Vater" des DLA Systems, H. M. Vriesendorp, danke ich für einen lehrreichen und angenehmen Aufenthalt in Rotterdam im Sommer 1975.

Für die Übernahme der Reinschrift danke ich Frä. Heidi Korsch.

XI. Literaturverzeichnis

- 1) Ahrons, S. & Kissmeyer-Nielsen, F. (1973) :
HLA typing, influence of methodological variation.
Symp. Series Immunobiol. Standard 18, 85
- 2) Albert, E. D. (1972) :
Die Immunogenetik des Systems der menschlichen
Leukozyten-Iso-Antigene.
Habilitationsschrift in der Ludwig-Maximilians-
Universität München
- 3) Albert, E. D., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I. (1972) :
A new approach to cross-reactivity in the HLA system.
Symp. Series. immunobiol. Standard. 18, 156
- 4) Angress, S. and Reed, C. A. B. (1962) :
An annotated bibliography on the origin and descent
of domestic animals.
Fieldiana Anthropol. Chicago, 54 (1), 1900
- 5) Bach, F. H., Bach, M. L. and Klein, J. (1972) :
Genetic and immunological complexity of major
histocompatibility regions.
Science 176, 1024
- 6) Bachvaroff, R., Ozaki, A., Cannon, F. D., Mollen, N.,
Blumenstock, D. A., Ayvazian, J. H., Ferrebee &
Rapaport, F. T. (1973) :
Phenotypic Expression of the main histocompatibility
Complex (DLA) in randomly selected mongrel dogs:
I. Serologically detectable (SD) DLA antigens and
mixed leukocyte (MLC) reactivity.
Transpl. Proc. 5., 1561

- 7) Bachvaroff, R., Ozaki, A., Cannon, F. D. Mollen, N.,
Blumenstock, D. A., Ayzazian, J. H., Ferrebee, J. W. &
Rapaport, F. T. (1973) :
Phenotypic expression of the main histocompatibility
complex (DLA) in randomly selected mongrel dogs.
III. Inhibition of the mixed leukocyte culture
reaction during and after sensitization to skin
allografts.
Transpl. Proc. 5, 1863

- 8) Balner, H., Dersjant, H., Vreeswijk, V. W., v. Leeuwen, A.,
D'Amaro, J., Bruning, H. & van Rood, J. J. (1972) :
The major histocompatibility systems (MHS) of subhuman
primates. Current state and results of an international
workshop.

- 9) Balner, H., D'Amaro, J., Toth, E. K., Dersjant, H.,
& Vreeswijk, W. van (1973) :
The histocompatibility complex of rhesus monkeys.
Relationship between RhL-A and the main locus
controlling reactivity in mixed leukocyte cultures.
Transpl. Proc. 5 , 323

- 10) Balner, H. et al. (1976)
B-Cell specific or Ia - like antigens of rhesus
monkeys; a preliminary report (suggested title)
Nature (London) in press

- 11) Campbell, R. C. (1967) :
Statistics for biologists.
Cabridge University Press

- 12) Cepellini, R. (1967) : A preliminary report on the
3rd international workshop on histocompatibility
testing.

Advance in Transplantation, pp. 195 - 202.
Munksgaard, Copenhagen.

- 13) Ceppellini, R., Curtoni, E. S., Mattiuz, P. L.,
Miggiano, V., Scudeller, G. & Serra, A. (1967) :
Genetics of leukocyte antigens. A family study
of segregation and linkage.
Histocompatibility Testing 1967, pp. 149 - 185
Munksgaard, Copenhagen

- 14) Cleton, F. J. (1965) :
Iso-antibodies in dogs.
Histocompatibility Testing 1965, p. 263.
Munksgaard, Copenhagen

- 15) Cleton, F. J., Es, G. van, Ponsen, R. & Rood, J. J.
van (1967)
Leukocyte antigens in the dog
Histocompatibility Testing 1969, p. 277.
Munksgaard, Copenhagen

- 16) Dausset, J., Rapaport, F., T., Cannon, F. D. &
Ferrebee, J. W. (1971) : Histocompatibility studies
in a closely bred colony of dogs. III. Genetic defini-
tion of the DLA system of canine histocompatibility,
with particular reference to the comparative immuno-
genicity of the major transplantable organs.
J. exp. Med. 134, 1222

- 17) Does, J. A. van der, Rood, J. J. van, Walker, W. S.
& Epstein, R. B. (1973):
Consequent intrafamilial immunization for
DLA haplotyping in canines.
J. Exp. Med. 137, 494

- 18) Eijsvogel, V. P., Rood, J. J. van, du Toit, E. D. & Schellekens, P. Th. A. (1972) :
Position of a locus determining mixed lymphocyte reactions distinct from the known HLA loci.
Eur. J. Immunol. 2, 413

- 19) Eijsvogel, V. P., du Bois, M. J. G. J., Melief, C. J. M., Groot-Kooy, M. L., Koning, C. de, Rood, J. J. van, Leeuwen, A. van, du Toit, E. & Schellekens, P. Th. A. (1973) :
Position of the locus determining mixed lymphocyte reaction (MLR). Distinct from the known HLA loci and its relation to cellmediated lympholysis (CML). Histocompatibility Testing 1972, p 501.
Munksgaard, Copenhagen.

- 20) Eijsvogel, V. P., du Bois, R., Melief, C. J. M., Zeylemaker, Z., Raat-Koning, L. & de Groot-Kooy, L. (1973) :
Lymphocyte activation and destruction in vitro in relation to MLC and HLA.
Transpl. Proc. 5, 415

- 21) Epstein, R. B., Storb, R., Ragde, H. & Thomas, E. D. (1968):
Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs
Transplantation 6,45

- 22) Ferrara, G. B., Tosi, R., Azzolina, G. Carminati, G. & Longo, A. (1973) :
Production of isoantisera for HLÃ typing by planned immunization. A four years's experiment.
Symp. Series. Immunbiol. Standard. 18, 20

- 23) Ferrebee, J. W., Cannon, F. D., Mollen, N. & St. John, D. (1970):
Beagles for studies of histocompatibility and organ transplantation.
Transplantation 9, 68

- 24) Friedmann, E. A., Retan, J. W., Marshall, D. C., Henry, L. & Merrill, J. P. (1961) :
Accelerated skin graft rejection in humans preimmunized with homologous peripheral leukocytes.
J. clin. Invest. 40, 2162 - 2170

- 25) Gluckmann, E., Schroeder, M. L., Storb, R., Goselink, H., Johnson, S., Graham, T. C., Pretorius, G. & Thomas, E. D. (1975) :
One-way nonstimulation of mixed leukocyte culture in dog families
Transplantation 19, 36

- 26) Grosse-Wilde, H., Baumann, P., Netzel, B., Kolb, H. J., Wank, R., Mempel, W. & Albert, E. D. (1973) :
One-way nonstimulation in MLC related to DLA homozygosity.
Transpl. proc. 5, 1567

- 27) Grosse-Wilde, H., Vriesendorp, H. M., Wank, R., Mempel, W., Dechamps, B., Honauer, U., Baumann, P., Netzel, B., Kolb, H. J. & Albert, E. D. (1974) :
Identification of four MLC-specificities in the dog.
Tissue Antigens, 4, 229

- 28) Grosse-Wilde, H., Vriesendorp, H. M., Netzel, B., Mempel, W., Kolb, H. J., Wank, R., Thierfelder, S. & Albert, E. D. (1975)
Immunogenetics of seven LD Alleles of the DLA-complex in mongrels, beagles, and labradors.
Transpl. Proc., 7, 159

- 29) Hardy, G. H., (1908) :
Mendelian proportions in a mixed population.
Science 28, 49.
- 30) Joint Report of 1st International Workshop on
canine immunogenetics
(1973): Tissue Antigens 3, 145
- 31) Joint Report of 2nd International Workshop on
canine immunogenetics
(1976). Tissue Antigens (in press)
- 32) Klein, J. & Shreffler, D. C. (1972) :
HLA - Model of the H-2 System
Tissue Antigens 2,78- 83
- 33) Klein, J., (1973) :
The H-2 System. Past and present.
Transplantation Proceedings 5,11
- 34) Kolb, H. J., Rieder, I., Grosse-Wilde, H.,
Scholz, S., Kolb, H., Wallner, B., Netzel, B., Albert,
E. D. & Thierfelder, S. (1975) :
Canine marrow grafts in donor-recipient combinations
with one-way nonstimulation in mixed lymphocyte culture.
Transpl. Proc. 7, 461
- 35) Kolb, H. J., Rieder, I., Grosse-Wilde, H., Abb, J., Albert,
E. D., Kolb, H., Schäffer, E. & Thierfelder, S., (1976):
Marrow grafts in LD-SD typed dogs treated with
cyclophosphamide.
Transpl. Proc. (in press)
- 36) Kolb, H. J., Rieder, I., Grosse-Wilde, H., Albert, E. D.,
Schramm, T., Thierfelder, S. (1976) :

Marrow grafts between one haplotype different canine family members.

Abstract for Transpl. Congress 1976 (in press).

- 37) Medawar, P. B.: Immunity to homologous grafted skin. II. The relationships between the antigens of blood and skin.
Brit. J. Exp. Path. 27:15 (1946)
- 38) Mittal, K. K., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I. (1972) :
Cross-reactive antibodies in 'duospecific' anti-HLA antisera.
Symp. Series immunobiol. Standard. 18, 165
- 39) Müller-Eckhardt, C., Heinrich, D. & Rothenberg, V. (1972) :
Frequency and complexity of cross-reactive HLA-antibodies. Elution studies with platelets.
Symp. Series immunobiol. Standard. 18, 171
- 40) Ozaki, A., Bachvaroff, R., Cannon, F. D., Mollen, N., Blumenstock, D. A., Ayvazian, J. H., Ferrebee, J. W. & Rapaport, F. T. (1973) :
Phenotypic expression of the main histocompatibility complex (DLA) in randomly selected mongrel dogs:
II. Serologically detectable (SD) compatibility MLC reactivity, and skin allograft survival.
Transpl. Proc. 5, 1781
- 41) Rapaport, F. T., Hanaoka, T., Shimada, T., Cannon, F.D. & Ferrebee, J. W. (1970) :
Histocompatibility studies in a closely bred colony of dogs. I. Influence of leukocyte group antigens upon renal allograft survival in the unmodified host.
J. exp. Med., 131, 881

- 42) Rapaport, F. T., Boyd, A. D., Spencer, F. C.,
Lower, R. R., Dausset, J., Cannon, F. D. & Ferrebee,
J. W. (1971) :
Histocompatibility studies in a closely bred colony
of dogs. II. Influence of the DLA system of canine
histocompatibility upon the survival of cardiac
allografts.
J. exp. Med., 133, 260
- 43) Rapaport, F. T., Watanabe, K., Cannon, F. D., Mollen, N.,
Blumenstock, D. & Ferrebee, J. W. (1972) :
Histocompatibility studies in a closely bred colony
of dogs. IV. Tolerance to bone marrow, kidney and skin
allografts in DLA-identical radiation chimaeras.
J. Exp. Med. 136, 1080
- 44) Rood, J. J. van (1973) :
LD-SD interaction in vivo and the allograft reaction.
Transpl. Proc. 5, 1747
- 45) Rubinstein, P., Morgado, F., Blumenstock, D. A. &
Ferrebee, J. W. (1968) :
Isohemagglutinins and histocompatibility in the dog.
Transplantation 6, 961
- 46) Staub-Nielsen, L., Ryder, L. & Svejgaard, A. (1972) :
HLA-Immunization in pregnancy.
Symp. Series immunobiol. Standard. 18, 182
- 47) Storb, R., Kolb, H. J., Graham, Th. C., Leblond, R.,
Kolb, H., Lerner, K. G. & Thomas, E. D. (1972) :
Marrow grafts between histoincompatible canine
family members.
Europ. Journal of Clin. and Biol. Research 15, 680

- 48) Storb, R., Rudolph, H., Kolb, H. J., Graham, T.C.,
Mickelson, E., Erickson, V., Lerner, K. G.,
Kolb, H. & Thomas, E. D. (1973) :
Marrow grafts between DLA-matched canine littermates.
Transplantation 15, 92
- 49) Templeton, J. W. & Thomas, E. D. (1971) :
Evidence for a major histocompatibility locus in the
dog.
Transplantation 11, 429
- 50) Terasaki, P. I. & McClelland, J. D. (1964) :
Microdroplet assay of human serum cytotoxins.
Nature (London) 204, 998
- 51) Tweel, J. G. van den, Vriesendorp, H. M., Termijtelen, A.,
Westbroek, D. L., Bach, M. C. & Rood, J. J. van (1974) :
Genetic aspects of canine mixed leukocyte cultures.
J. Exp. Med. 140, 825
- 52) Vriesendorp, H. M., Rothengatter, C., Bos, E., Westbroek, D. L.
& Rood, J. J. van (1971) :
The production and evaluation of dog allolymphocytotoxins
for donor selection in transplantation experiments.
Transplantation 11, 440
- 53) Vriesendorp, H. M., Epstein, R. B., D'Amaro, J.,
Westbroek, D. L. & Rood, J. J. van (1972):
Polymorphism of the DLA system.
Transplantation 14, 299
- 54) Vriesendorp, H. M., D'Amaro, J., Does, J. A. van der
Westbroek, D. L. & Epstein, R. B. (1973) :
Analysis of the DLA system in families and populations
of healthy and diseased individuals
Transpl. Proc., 5, 311

- 55) Vriesendorp, H. M. (1973) :
The major histocompatibility complex of the dog.
Thesis Erasmus University, Rotterdam
- 56) Vriesendorp, H. M., Zurcher, C. & Bekkum D. W. van (1975) :
Engraftment of allogeneic dog bone marrow.
Transpl. Proc. 7, 465
- 57) Weinberg, W. (1908) :
Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen.
Jahreshefte Verein f. vaterl. Naturk. in Württemberg
64, 368
- 58) Zaalberg, O. B., Fasbender, M. J. & Balner, H. (1976)
Ia - Like Antigens of rhesus monkeys are
distinct from conventional RhL-A Antigens, B 2 Micro-
globulin and immunoglobulin
Nature (London) in press

Lebenslauf

Ich, Thomas Schramm, wurde am 9. Juni 1951 als Sohn des Dr. med. Günther Schramm, Frauenarzt, und seiner Ehefrau Dr. med. Etta Schramm, geb. Sievers, in München geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich in München die Volksschule an der Haimhauserstraße. Von 1961 bis 1970 besuchte ich das Realgymnasium des Staatlichen Landschulheims in Marquartstein, wo ich im Sommer 1970 das Abitur bestand.

Im Herbst 1970 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität München, wo ich im Herbst 1976 mit dem Staatsexamen begann, das ich am 15. Dezember 1976 beendete.

